



# **O Papel da Autofagia na Remoção de Proteínas Oxidadas Perante a Inibição do Proteassoma**

VANESSA RAQUEL BOTELHO DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM  
MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR

**Dissertação da candidatura ao grau de Mestre em Medicina e Oncologia Molecular apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.**

**Trabalho realizado sob orientação do Doutor José Pedro Castro, desenvolvido no Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.**

*Ao Doutor José Pedro Castro*

*Ao Professor Doutor Henrique Almeida*

*À minha mãe*

*Aos meus irmãos e cunhados*

*Aos meus sobrinhos*

*Ao meu Pai*

## AGRADECIMENTOS

Seguramente este espaço limitado não me permite agradecer como devia a todas as pessoas que me acompanharam neste percurso, no entanto o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

À professora Deolinda Lima, diretora do Departamento de Biologia Experimental aquando da minha entrada para o grupo Ageing and Stress e ao Professor Castro Lopes, atual diretor, agradeço por me terem aceite como novo membro para desenvolver este projeto.

Ao Professor Doutor Henrique Almeida expresso um profundo sentimento de reconhecido agradecimento pela oportunidade que me deu em integrar no seu Grupo de Investigação no Departamento de Biologia Experimental e pela disponibilidade, paciência, dedicação e profissionalismo.

Ao Doutor José Pedro Castro um profundo agradecimento pela orientação e apoio que elevaram, sem dúvida, os meus conhecimentos científicos e por me confiar a continuidade do seu trabalho.

À Professora Doutora Delminda agradeço por toda a disponibilidade e agrado que demonstrou ao esclarecer qualquer dúvida.

À Professora Doutora Alexandra e à Professora Doutora Elisabete, agradeço pelo apoio moral, orientação e disponibilidade, que me permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao Professores Doutor Filipe Monteiro e ao Professor Doutor Carlos Reguenga pela disponibilidade e generosidade reveladas, agradeço a oportunidade de discutir ideias, obtendo sugestões e esclarecimentos de grande valor.

À Liliana e à Adriana, agradeço não só toda a paciência que tiveram para esclarecer todas as dúvidas científicas, mas também por todas as palavras sensatas e carinhosas que sempre tranquilizaram as minhas preocupações.

À Catarina, Sandra e Ana Isabel obrigada pelo nosso misto de trabalho e lazer que permitiram que cada dia fosse encarado com outra motivação.

Ao Sérgio muito obrigada por todo o carinho, conforto, e incentivo que sempre demonstrou ao longo desta etapa.

À equipa LAIMM, Filipa, Ana, Sofia, Daniel e António agradeço por me ajudaram direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos, assim como agradeço por todos os momentos de descontração.

Ao César e a Isabel agradeço pelo conhecimento transmitido ao longo da realização deste trabalho.

À Anabela agradeço pela valiosa ajuda laboratorial que contribuiu para a realização desta tese.

À Maria Salazar muito obrigada pela excelente colega de trabalho que és, mas acima de tudo a melhor amiga que tens sido durante estes 8 anos. Obrigada pelo companheirismo, dedicação, lealdade e carinho. Obrigada por me fazeres perceber que há sempre luz ao fundo do túnel e obrigada mais uma vez porque, na realidade, sem ti dificilmente conseguiria terminar esta última etapa.

Às minhas amigas Rita Machado, Rita Azevedo e Paula Costa, obrigada por serem as melhores pessoas que conheci até hoje e obrigada por se manterem a meu lado em todas as circunstâncias.

Ao André Brito e ao David Silva obrigada pela amizade incondicional durante estes 12 anos.

Ao Nuno Guimarães e ao João Peixoto obrigada por todas as cafésadas e pelos excelentes anos de convívio.

À Raquel e a Lúcia agradeço todo o companheirismo, porque apesar dos quilómetros de distância sempre se mantiveram perto.

À minha equipa da ZARA 3258, agradeço por todo o apoio e compreensão nas horas de cansaço durante estes 6 anos. Agradeço especialmente às amigas e colegas de trabalho Tânia Sousa, Sara Resende, Joana Teles, Andrea Silva, Sara Pinho, Raquel Brandão e Marisa Ribeiro pelo incansável apoio moral e carinho.

Agradeço aos meus encarregados Bárbara Costa, Maria dos Santos, Diana Penides, Nuno Melro, Sónia Castro e Andreia Carvalho, que sempre reconsideraram todas as hipóteses para que de alguma maneira conseguisse conciliar os estudos, o trabalho, e o lazer.

À minha mãe, às minhas irmãs Rute, Mónica, e Paula, aos meus irmãos Armandino, Fernando e Vítor, agradeço pelo inestimável apoio familiar que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos.

Aos meus sobrinhos e cunhados agradeço todo o apoio, companheirismo e encorajamento em todos os momentos.

Agradeço à pessoa mais importante da minha vida, à pessoa que mais orgulho sentiria com a chegada deste dia... **OBRIGADA PAI**, obrigada pelo que foste e obrigada pela pessoa que me foste tornando...



# ÍNDICE GERAL

<b>ÍNDICE GERAL .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
1. ENVELHECIMENTO E STRESSE OXIDATIVO .....	8
2. ORIGEM DA OXIDAÇÃO .....	10
2.1 ROS .....	10
2.2 Antioxidantes .....	11
3. OXIDAÇÃO .....	13
3.1 Oxidação proteica .....	13
3.2 Carbonilação .....	14
3.3 Oxidação proteica como um biomarcador de stresse oxidativo .....	15
4. PROTEOSTASIA E SISTEMAS PROTEOLÍTICOS .....	16
4.1 Suscetibilidade proteolítica após modificações oxidativas .....	16
4.1.1 Agregados proteicos .....	17
4.2 Proteassoma .....	18
4.2.1 Degradação de proteínas oxidadas pelo proteassoma 20S .....	18
4.3 Autofagia .....	19
4.3.1 Mecanismo molecular da macroautofagia .....	20
4.4 Cross-talk entre o proteassoma e autofagia .....	23
5 OBJETIVO .....	25
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
1. CULTURA DE CÉLULAS .....	27
1.1 Células Jurkat .....	27
1.2 Células HeLa .....	27
1.3 Viabilidade celular .....	28
2. PROCESSAMENTO DO PLASMÍDEO .....	29
2.1 Extração do plasmídeo .....	29
2.2 Purificação e quantificação do plasmídeo .....	29
2.3 Confirmação do plasmídeo .....	30
2.4 Gel de agarose - eletroforese .....	31
3. ANÁLISE MOLECULAR .....	32
3.1 Preparação das amostras para SDS-PAGE .....	32
3.2 SDS-PAGE .....	32

3.3	<i>Western Blotting</i> .....	32
3.4	<i>Oxyblot</i> .....	33
4.	IMUNOCITOQUÍMICA.....	35
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>RESULTADOS .....</b>		<b>36</b>
1.	EXPRESSÃO DE MARCADORES INTERVENIENTES NA AUTOFAGIA .....	37
1.1	<i>Cinética da marcação sob stresse</i> .....	37
1.2	<i>Efeito de inibidores</i> .....	38
1.3	<i>Quantificação de carbonilos</i> .....	38
2.	ATIVAÇÃO DA AUTOFAGIA .....	41
3.	OPTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA A TRANSFETAR PARA SOBREXPRESSÃO DA AUTOFAGIA .....	42
4.	AValiação DA VIABILIDADE CELULAR .....	43
5.	EFEITO DA TRANSFEÇÃO CELULAR NAS PROTEÍNAS INTERVENIENTES NA AUTOFAGIA.....	45
5.1	<i>Marcadores de autofagia</i> .....	45
5.2	<i>Proteínas carboniladas</i> .....	47
5.3	<i>Imunocitoquímica</i> .....	49
<b>DISCUSSÃO .....</b>		<b>50</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>		<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>59</b>

# **ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS**

<b>FIGURA 1</b> - Os marcos do envelhecimento: instabilidade genómica, diminuição dos telómeros, alterações epigenéticas, perda de proteostasia, desregulação sensitiva dos nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células estaminais e alteração da comunicação intercelular (Lopez-Otin et al., 2013). .....	8
<b>FIGURA 2</b> – Teor de proteínas carboniladas a partir de diferentes tecidos. Observa-se um aumento dramático de proteínas oxidadas durante o último terço de vida (R. L. Levine et al., 2001). .....	14
<b>FIGURA 3</b> – Suscetibilidade proteolítica de proteínas oxidativamente modificadas (T. Jung et al., 2009). .....	16
<b>FIGURA 4</b> – Aumento do dano oxidativo (T. Jung et al., 2007). .....	17
<b>FIGURA 5</b> – Estrutura e subunidades do proteassoma 20S (Tobias Jung et al., 2007). .....	19
<b>FIGURA 6</b> – Origens da membrana dupla, formação e maturação do autofagossoma (Rubinsztein et al., 2011). .....	21
<b>FIGURA 7</b> – Formação do autofagossoma e fusão lisossomal (Rajawat et al., 2009). .....	22
<b>FIGURA 8</b> - Estrutura do plasmídeo pcDNA3.1 hLC3B-mCherry. ....	30
<b>FIGURA 9</b> – Expressão de marcadores de autofagia (Atg5,p62 e LC3) em células Jurkat submetidas a stresse oxidativo (100µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em diversos tempos, ao longo de 48 horas, e controlo (-). LC3 é LC3I e LC3II; PS: Ponceau S. ....	37
<b>FIGURA 10</b> - Marcadores proteicos de autofagia (A,B e C) e proteínas carboniladas (D), após 3h e 24h de stresse oxidativo (100µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) quantificados por densitometria de bandas após Western blotting. ....	39
<b>FIGURA 11</b> - Plasmídeo pcDNA3.1 hLC3B-mCherry verificado por eletroforese em gel de agarose. ....	41
<b>FIGURA 12</b> - Ensaio de viabilidade das células HeLa sob efeito de diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	43
<b>FIGURA 13</b> - Ensaio de viabilidade das células HeLa transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherry sem stresse ou sob stresse com 100µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , durante 3 e 24 horas. ....	44
<b>FIGURA 14</b> – Marcadores proteicos de autofagia em células HeLa transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherry e submetidas a 100 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , durante 3 e 24h e estudo densitométrico de bandas após Wertern Blotting (B,C e D). ....	46
<b>FIGURA 15</b> - Pesquisa de proteínas carboniladas. ....	47
<b>FIGURA 16</b> - Imunocitoquímica de p62 em células HeLa em cultura ao fim 3 horas. ....	49
<b>TABELA 1</b> – Espécies reativas de oxigénio .....	11

# **L**ISTA DE ABREVIATURAS

**3-MA** - 3-Metiladenina

**AGEs** – Advanced glycation end products

**Akt** – proteína-cinase B

**Alfy** – Autophagy linked FYVE protein

**Atg** – autophagy related gene

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**DAPI** - 4,6-diamidino-2-phenylindole

**DMEM-F12** - *Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham F-12 medium*

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DNP** – Dinitrofenilhidrazona

**DNPH** - 2,4- Dinitrofenilhidrazina

**DTT** – ditioneitol

**EDTA** - ácido etilenodiaminotetraacético

**ELISA** – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FBS** - soro fetal bovino

**GLB** - *gel loading buffer*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de Hidrogénio

**Hsp70** – Heat Shock Protein 70

**LB agar/agar** - Luria Bertani Broth Agar

**LC3** – microtubule-associated protein 1 light chain 3

**mTOR** - *Mammalian Target of Rapamycin*

**mTORC1** - complexo 1 mTOR

**mTORC2** - complexo 2 mTOR

**NBR1** – neighbour of breast cancer 1

**NOX** – Complexo NADPH oxidase

**PE** – Lípido fosfatidiletanolamina

**PI3K** – phosphoinositide 3-kinase

**RE** – Reticulo endoplasmático

**RNS** – Espécies Reativas de Nitrogénio

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigénio

**RPMI** – Roswell Park Memorial Institute

**SDS** - dodecil sulfato de sódio

**SEM** - erro padrão para a média

**SQSTM1/p62** – proteína adaptadora 1

**TAE** - tampão Tris-Acetato-EDTA

**TFA** - ácido trifluoroacético

**WB** – Western Blotting



# **R**ESUMO

O envelhecimento é caracterizado pela perda progressiva de integridade fisiológica, levando à perda de funcionalidades e aumento da vulnerabilidade à morte.

Evidências experimentais mostram que muitas das modificações observadas durante o envelhecimento são consequência de dano oxidativo. O stresse oxidativo, resultado de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes tendendo para os primeiros, leva ao romper da sinalização redox e promove danos oxidativos. Uma importante categoria de biomoléculas sensíveis à oxidação são as proteínas, cujas consequências resultantes conduzem a alterações estruturais que antecedem a perda de funcionalidade.

Uma modificação oxidativa frequente é a carbonilação proteica, um evento irreversível não enzimático característico de células envelhecidas. As proteínas carboniladas têm sido utilizadas como marcadores de dano oxidativo acentuado uma vez que se podem tornar disfuncionais e acumularem como agregados insolúveis que alteram a funcionalidade celular. De forma a lidar com proteínas carboniladas e para impedir a sua acumulação, as células utilizam o proteassoma, a principal estrutura de degradação não lisossomal. O proteassoma é um sistema catalítico complexo que apresenta duas formas predominantes, o núcleo catalítico do complexo 20S, que é independente de ATP e de ubiquitinação, e o 26S, que combina o núcleo 20S e pelo menos um regulador 19S. Demonstrou-se que o proteassoma 20S é o principal local para a degradação de proteínas oxidadas; no entanto, se a taxa de degradação for inferior à taxa de formação de proteínas carboniladas, tendem a formar-se agregados proteicos que posteriormente inibem o proteassoma.

Um estudo anterior mostrou que células sob stresse oxidativo acumulavam proteínas oxidadas seguindo-se a formação de agregados proteicos insolúveis ao longo do tempo. Além disso, os agregados levaram à diminuição da proliferação e da atividade do proteassoma. Recentemente, verificou-se que a macroautofagia estava aumentada sob estas condições, possivelmente, como um mecanismo de compensação. Variados estudos sugerem a existência de uma relação estreita entre o proteassoma, a autofagia e a patogénese de muitas doenças. Para manter a homeostasia, a autofagia é acionada, funcionando como um sistema de digestão intracelular seletivo, que é fortemente regulado por inúmeras proteínas relacionadas com a autofagia. Devido ao facto destes serem os dois principais sistemas de degradação celular, foi relevante entender quando e como cooperam aquando acumulação de proteínas oxidadas.

Tirando vantagem do nosso modelo de stresse oxidativo pré-estabelecido, utilizando inibidores para ambos os sistemas degradativos e recorrendo a um plasmídeo para sobreexpressão da proteína LC3B, pretendeu entender-se os mecanismos de compensação entre os dois sistemas de degradação celular. Através da análise da expressão das proteínas intervenientes na autofagia, LC3, p62 e atg5, em paralelo com a análise de proteínas oxidadas,

confirmou-se que havia uma indução da autofagia aquando a inibição do proteassoma, embora o inverso não se tenha verificado.

A transfeção transiente para sobreexpressar a proteína LC3B, que é um dos intervenientes principais na formação de autofagossomas durante a autofagia, teve como intuito antecipar a ativação da autofagia em células sujeitas a stresse oxidativo. Este processo tinha como objetivo impedir a inibição do proteassoma, pois em trabalhos anteriores tinha sido verificado que este complexo perdia a sua atividade pela formação de proteínas oxidadas na forma de agregados enquanto as células se encontravam sob stresse oxidativo. Nos nossos resultados observou-se que a sobreexpressão da LC3B mostrou ser favorável para a degradação de proteínas oxidadas não a curto, mas a longo prazo, o que vai de acordo com os nossos tempos diferentes pré-estabelecidos.

Através dos nossos resultados conclui-se que a proteostasia celular está então dependente da interação da via proteassomal e lisossomal, onde a sobreexpressão da proteína LC3B parece ser uma estratégia útil no combate à acumulação de agregados proteicos induzidos pelo dano oxidativo.

No entanto, mais estudos serão necessários para aprofundar o mecanismo que regula a interação entre estes dois sistemas, de modo a entender a forma como a célula pode prevenir a acumulação de agregados proteicos e evitar a aquisição de características relacionadas ao envelhecimento.

# **A**bstract

Aging is characterized by a progressive physiological integrity loss, leading to impaired function and increased vulnerability to death.

Collecting evidence back up the view that many of the changes observed during aging are consequence of oxidative damage. Oxidative stress, resulting from an imbalance between oxidants and anti-oxidants in favor of the former, leads to a disruption of redox signaling and to molecular damage. An important category of biomolecules susceptible to oxidation are proteins, whose resulting consequences lead to structural changes that antedate loss of function.

A frequent oxidative modification is protein carbonylation, a non-enzymatic irreversible event and a common feature of aged cells. Carbonylated proteins have been used as a severe oxidative damage marker as they can become dysfunctional and accumulate as insoluble protein aggregates that alter cellular functionality. To cope with carbonylated proteins and to prevent their accumulation, cells employ the proteasome, the main non-lysosomal degradative structure. The proteasome is a complex catalytic system that exhibits two predominant forms, the 20S catalytic core, which is ATP and ubiquitin tagging independent, and the 26S form that combines the 20S core and at least one 19S regulatory cap. The 20S proteasome form has been shown to be the main site for oxidized protein degradation; however, if the degrading rate is inferior to carbonylated proteins formation rate, protein aggregates form and inhibit the proteasome.

In a previous study, oxidative stress challenged cells accumulated oxidized proteins followed by insoluble protein aggregates in a time-dependent manner. Furthermore aggregates lead to proliferation impairment and proteasome activity diminishment. Recently, we found macroautophagy to be upregulated under these conditions, possibly as a compensatory mechanism. As a variety of studies suggest there is an existence of a close relationship between the proteasome, autophagy and pathogenesis of many diseases. To maintain homeostasis, autophagy is triggered as a selective intracellular digestion system, which is highly regulated by a number of autophagy-related proteins. Due to the fact that these are the two main cellular degradative systems, it is relevant to understand if and how they cooperate when oxidized proteins accumulate.

Taking advantage of our pre-established stress model, using inhibitors for both degradative systems and a plasmid for LC3B overexpression, we decided to understand the compensatory mechanism between the two cellular degradative systems. Through analysis of the expression of proteins LC3, p62 and Atg5, involved in autophagy, in parallel with analysis of oxidized proteins, it was confirmed that there was an induction of autophagy upon inhibition of the proteasome, but the reverse mechanism was not observed.

Transient transfection to overexpress the protein LC3B, which is one of the most important players in autophagosome formation during autophagy, was proposed to anticipate the activation of this pathway when cells were subjected to oxidative stress. The aim of this process was to prevent inhibition of the proteasome, since in previous studies it was found that this complex lost its activity by the formation of oxidized proteins in the form of aggregates while cells were under stress. Our results suggest that overexpression of LC3B proved to be favorable for degradation of oxidized proteins not for short, but for long term according to our pre-established time-points.

Taking into account our results, we conclude that cellular proteostasis is dependent on the interaction of proteasomal and lysosomal pathways in which LC3B overexpression seems to be a useful strategy against protein aggregates induced by oxidative damage.

However, ongoing studies should follow to go deep into the mechanism that regulates the crosstalk between the two major systems, in order to understand how can the cell prevent protein aggregates accumulation and avoid age related features.

# INTRODUÇÃO

## 1. ENVELHECIMENTO E STRESSE OXIDATIVO

Nos eucariontes, os organismos multicelulares podem ser extraordinariamente complexos, mas compõem-se de pequenas entidades denominadas células, que constituem a sua unidade estrutural e funcional (Azevedo, C., 2005).

As células possuem uma organização molecular que lhes permite desempenhar ações que sustentam a vida: crescer, adaptar-se ao meio exterior e reproduzir-se. Nessa organização comum, a sobrevivência é assegurada por diferentes estruturas com tarefas próprias. Contudo, no decorrer do ciclo da vida, a eficiência dessas tarefas parece sofrer involução, que limita a funcionalidade e compromete a homeostasia celular. Este processo involutivo, habitualmente associado ao envelhecimento, tem merecido especial atenção da comunidade científica, nas últimas décadas.

A razão reside no facto de o envelhecimento biológico ser um processo inevitável e representar o maior fator de risco para o aparecimento e desenvolvimento de entidades como o cancro, as doenças neurodegenerativas, as cardiovasculares e a morte (Squier, 2001).

Lopez-Otin e colaboradores (Lopez-Otin et al., 2013) consideraram nove processos biológicos representativos do envelhecimento nos diferentes organismos. Apesar de todos contribuírem para tal, a perda de homeostasia proteica, a proteostasia, parece ter especial importância já que, todos os processos celulares dependem de um proteoma funcional (figura 1).



**FIGURA 1 - Os marcos do envelhecimento:** instabilidade genómica, diminuição dos telómeros, alterações epigenéticas, perda de proteostasia, desregulação sensitiva dos nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células estaminais e alteração da comunicação intercelular (Lopez-Otin et al., 2013).



Para manter a proteostasia, as células empregam uma variedade de estratégias através de mecanismos muito sofisticados que modulam a estrutura e a função das proteínas, enquanto regulam a sua síntese e degradação. Vias de sinalização específicas, ativadas para responder ao stresse, são reguladas a partir de sensores que conseguem detetar níveis anormais de proteínas com *folding* incorreto ou na forma de agregados proteicos (Lindquist et al., 2011). A este respeito, tem sido sugerido que a formação de agregados proteicos, consequentes à oxidação e nitração, são a base para a perda da funcionalidade celular. De facto, as proteínas modificadas pela oxidação, assumem uma estrutura terciária instável, parcialmente desdobrada, e rapidamente formam agregados (Squier, 2001).

Entre as várias teorias mecanicistas propostas para explicar o processo de envelhecimento, uma delas contribuiu de modo considerável para explicar a causa dos danos associados ao envelhecimento. Trata-se da Teoria do Stresse Oxidativo (Edrey et al., 2014), abordada posteriormente.

Helmut Sies designou o stresse oxidativo como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes (Sies, 1997). O seu aparecimento depende da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e da incapacidade de os remover quer por meio do sistema antioxidante celular quer pela presença de micronutrientes adquiridos na dieta (Hohn et al., 2013).

Têm sido descritas diversas modificações que ocorrem durante o envelhecimento e a progressão de doenças com ele relacionado, como consequência do aumento de stresse oxidativo (R. L. Levine et al., 2001; Stadtman, 1992). Assim, colocado o envelhecimento como um desequilíbrio entre a produção e a remoção de ROS, neste caso a favor da produção de ROS, o resultado é o aumento de proteínas e lípidos oxidados, e a sua acumulação na forma de agregados proteicos e de produtos finais da glicação avançada (AGEs - Advanced glycation end products) (Hohn et al., 2013).

## 2. ORIGEM DA OXIDAÇÃO

### 2.1 ROS

No metabolismo aeróbio, que necessita de  $O_2$ , a produção de ROS é inevitável (Gutteridge et al., 2010). Tal decorre do facto de, na orbital externa da molécula de oxigénio haver dois eletrões desemparelhados, condição que torna a sua estrutura reativa, e o designa como radical livre.

Denham Harman propôs que os radicais livres formados no decurso dos processos metabólicos endógenos, desempenham um papel decisivo no processo do envelhecimento (Harman, 1956). As maiores fontes de ROS são a mitocôndria, o retículo endoplasmático (RE), o peroxissoma e o complexo NADPH oxidase (NOX) (Wen et al., 2013). A formação de ROS mitocondriais ocorre durante o processo de transporte de eletrões na membrana interna, predominantemente no complexo I (NADH-desidrogenase) ou III (citocromo redutase), provocado por daqueles, que ficam livres e não reduzem completamente o oxigénio molecular. Os complexos *redox* da cadeia de transporte de eletrões da mitocôndria facilitam esse transporte até ao aceitador final, o oxigénio molecular. A captação de um só eletrão pelo oxigénio molecular ( $O_2$ ) forma um radical livre, o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); ao invés, a redução completa do  $O_2$  com 4 eletrões gera moléculas de água. Apesar do anião superóxido não ser um radical muito ativo, pode reagir com outras moléculas e formar outras espécies reativas como o  $H_2O_2$  (Quinlan et al., 2013). Embora predominem as reações de um eletrão, as reações de dois eletrões também ocorrem e permitem a redução direta do oxigénio molecular para peróxido de hidrogénio (Finkel, 2011).

A formação de oxidantes também pode ocorrer em consequência da ação de uma ampla gama de agentes exógenos, incluindo radiação (raio X, gama, ultravioleta, ou luz visível na presença de um sensibilizador), iões metálicos, solventes, partículas em suspensão presentes no ar, óxidos de nitrogénio e ozono (M. J. Davies, 2005).

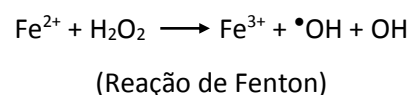
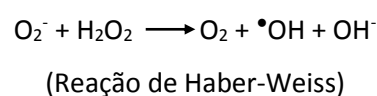
A hipótese de Harman tem sido refinada ao longo do tempo, para poder abranger não só radicais livres, mas também outras formas ativas de oxigénio uma vez que muitas espécies reativas de oxigénio, como peróxidos e aldeídos, não considerados radicais livres, também exercem um papel importante no dano oxidativo nas células (Muller et al., 2007). A consequência desses danos oxidativos depende do tipo de célula, das espécies de ROS, da sua concentração, localização e tempo de semi-vida (Fedorova et al., 2009).

Acresce que, além do oxigénio, o azoto tem também um papel relevante no dano de componentes celulares pela ação das espécies reativas de nitrogénio (RNS) (**Tabela 1**).

**TABELA 1** – Espécies reativas de oxigénio e nitrogénio.

<b>Espécies reativas de oxigénio</b>
Anião superóxido $O_2^-$
Ião hidroxilo $OH^-$
Oxigénio atómico $O^-$
Peroxilo $ROO^-$
Alkoxi $RO^-$
Peróxido de hidrogénio $H_2O_2$
Hipoclorito $HOCl$
<b>Espécies reativas de nitrogénio</b>
Peroxinitrito $ONOO^-$
Dióxido de Nitrogénio $NO_2^-$
Nitrato/nitrito $NO_3^-/NO_2^-$

O termo ROS/RNS inclui estruturas radicais e não radicais, mas ambas quimicamente reativas. Um modelo de espécie reativa de oxigénio não radical é o  $H_2O_2$ , facilmente oxidado na presença de um ião metálico, como o Ferro, e gerador do radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), extremamente reativo (reação de Fenton e Haber-Weiss) (Hohn et al., 2013).



Os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) são menos reativos mas não menos importantes pela sua abundância intracelular por via da sua formação endógena (Hohn et al., 2013).

O reconhecimento de que nem todas as espécies reativas são radicais livres, motivou a alteração da teoria do envelhecimento por radicais livres para teoria do envelhecimento por stresse oxidativo, como referido anteriormente (Muller et al., 2007).

Apesar de se reconhecer aos ROS um papel nefasto na função celular e nas macromoléculas, também já lhes foi atribuído um papel regulador em variados processos celulares, como eventos redox dependentes de sinalização que envolve pós-tradução e modificação oxidativa de proteínas (Eaton, 2006; J. Wang et al., 2008).

## 2.2 Antioxidantes

O conceito biológico de antioxidante refere-se a qualquer composto que, quando presente numa concentração mais baixa que o substrato oxidável, é capaz de atrasar ou inibir a sua oxidação (Halliwell et al., 1995). Posteriormente, a definição foi alterada para “substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo da célula alvo” (Halliwell, 2007).

A ação dos antioxidantes implica a redução do stresse oxidativo, de mutações no DNA, e também de transformações malignas. Estudos epidemiológicos demonstraram, a capacidade

dos antioxidantes na contenção dos efeitos gerados pelas espécies reativas de oxigênio e a diminuição na incidência de doenças degenerativas (Pisoschi et al., 2015).

A homeostasia redox da célula é garantida pelo seu complexo sistema endógeno de defesa antioxidante, que inclui enzimas como a dismutase do anião superóxido, a catalase, a glutational peroxidase e compostos não enzimáticos, tais como a ferritina, a transferrina, a ceruloplasmina, ou a albumina. Incluem-se outras moléculas, captadores de baixo peso molecular, de que são exemplo o ácido úrico, a coenzima Q e o ácido lipóico, também com ação antioxidante. Outras ainda, provenientes de frutos e vegetais, de que são exemplos as vitaminas C e D, carotenóides e compostos fenólicos, são atualmente considerados como importantes agentes antioxidantes exógenos (Pisoschi et al., 2015).

A intervenção dos antioxidantes é diversificada e consiste em eliminar espécies iniciadoras da oxidação, quelar iões metálicos, tornando-os incapazes de gerar espécies reativas, decompor peróxidos, eliminar  $O_2^-$  e prevenir a formação de peróxidos, reduzir as concentrações locais de  $O_2$ , quebrar a reação em cadeia de auto-oxidação e destruir a cadeia radical, do que resultam radicais menos reativos (Noori, 2012; Oroian et al., 2015).

### 3. OXIDAÇÃO

Apesar das alterações do stresse oxidativo afetarem lípidos, hidratos de carbono e DNA (ácido desoxirribonucleico), as proteínas são o alvo maior das espécies reativas de oxigénio; de facto, estima-se que 68% da globalidade de moléculas oxidadas nas células sejam proteínas (Cerny et al., 2013).

#### 3.1 Oxidação proteica

A exposição de proteínas à ação de oxidantes resulta em alterações na conformação da estrutura da molécula, que podem incluir a fragmentação da sequência primária, oxidação de grupos de cadeia lateral dos aminoácidos, o enovelamento e desdobramento da proteína, e alterações na hidrofobicidade e na vulnerabilidade às enzimas proteolíticas (Headlam et al., 2004).

Quase todos os aminoácidos das proteínas são alvos potenciais da oxidação por ROS (Bokov et al., 2004) e as modificações oxidativas das proteínas podem ser classificadas em duas categorias: a reversível e a irreversível (Stadtman et al., 2003).

Os resíduos de metionina e cisteína, por exemplo, são extremamente sensíveis a danos oxidativos. Esses resíduos são facilmente oxidados graças aos seus centros de enxofre, razão por que são os principais locais de oxidação das proteínas. Tal oxidação pode advir, da ação direta do oxidante ou dos processos de transferência de radicais no interior da proteína, após a oxidação em locais distantes (Davies, 2005). Ao contrário de outros, estes resíduos com enxofre sofrem oxidação reversível, graças à atividade de dissulfeto redutases; mas, se a oxidação for contínua, pode gerar ácido sulfinico e sulfóxido, irreversíveis (Pisoschi et al., 2015; Stadtman et al., 2003). Por exemplo, o sulfóxido de metionina resultante da oxidação, pode ser convertido em metionina novamente pela metionina sulfóxido redutase usando a propriedade redutora do cofator tioredoxina (Bokov et al., 2004).

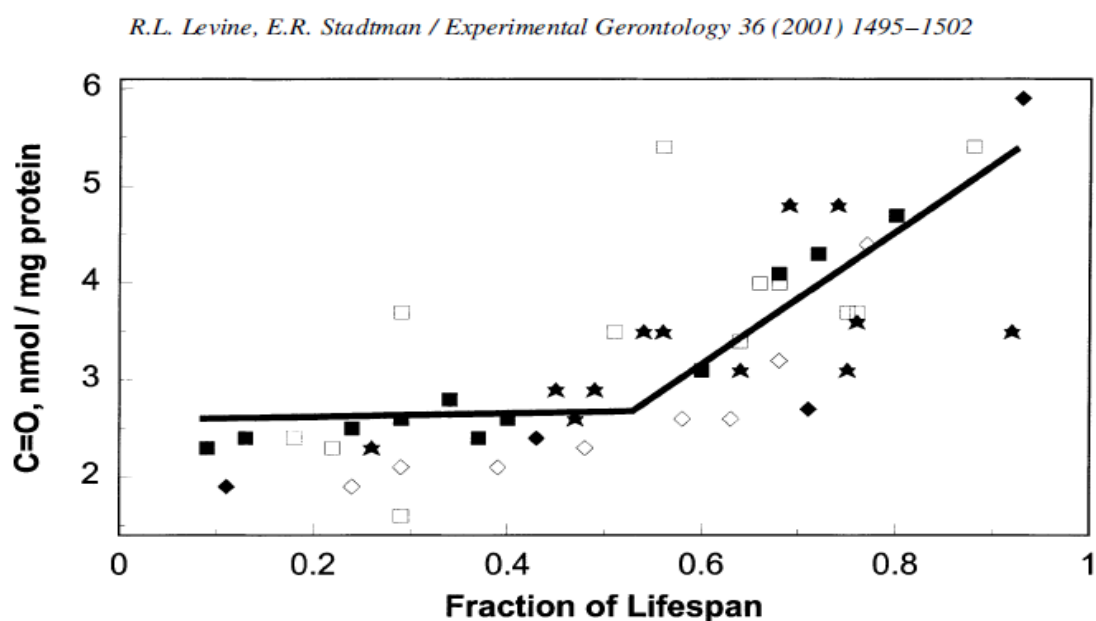
Em contraste com a oxidação dos resíduos de cisteína e metionina, a carbonilação de proteínas é um processo irreversível que atinge com especial incidência os aminoácidos lisina, arginina, prolina, e treonina. A carbonilação proteica está geralmente associada à perda de função, do que resulta degradação das proteínas modificadas, sua substituição após síntese *de novo*, ou por vezes a sua agregação (Abou-Zeid et al., 2014).

### 3.2 Carbonilação

As modificações proteicas podem ser provocadas por um ataque direto sobre resíduos de lisina, arginina, prolina ou treonina, como se referiu, ou por uma reação secundária nos resíduos de cisteína ou histidina conducentes à formação de derivados de proteínas carboniladas (aldeídos ou cetonas). Elevados níveis de proteínas carboniladas, são geralmente sinal de elevados níveis de stresse oxidativo (Dalle-Donne et al., 2003). Visto que as alterações podem ocorrer em resíduos de diversos aminoácidos e não só um, o impacto é maior que quaisquer outras modificações e é, portanto, mais facilmente detetável (Cai et al., 2013). Todavia, a carbonilação de um resíduo pode ser suficientemente severa para causar a perda funcional de uma proteína, como acontece quando a oxidação de um dos resíduos de histidina da enzima glutamina sintetase resulta na sua inativação. (R. L. Levine, 1983).

Oliver mostrou que os carbonilos se acumulavam nas proteínas, após verificar que fibroblastos em cultura celular provenientes de um individuo saudável com idade de 60 anos exibia maiores níveis de carbonilos do que indivíduos mais jovens (Oliver et al., 1987). Esta observação, e outras, fundamentaram a proposta de que a oxidação proteica era importante no desenvolvimento de uma variedade de doenças e também no processo de envelhecimento (Stadtman, 1988).

Em seu apoio, foi reportado o teor em carbonilos de tecidos ou organismos completos, durante o seu ciclo de vida (**figura 2**). Aí se mostra que esse teor aumenta drasticamente no último terço de vida, de tal modo que nessa altura, uma em cada três moléculas sofre a alteração (R. L. Levine et al., 2001; Stadtman et al., 2000).



**FIGURA 2**– Teor de proteínas carboniladas a partir de diferentes tecidos. Observa-se um aumento dramático de proteínas oxidadas durante o último terço de vida (R. L. Levine et al., 2001).

### 3.3 Oxidação proteica como um biomarcador de stresse oxidativo

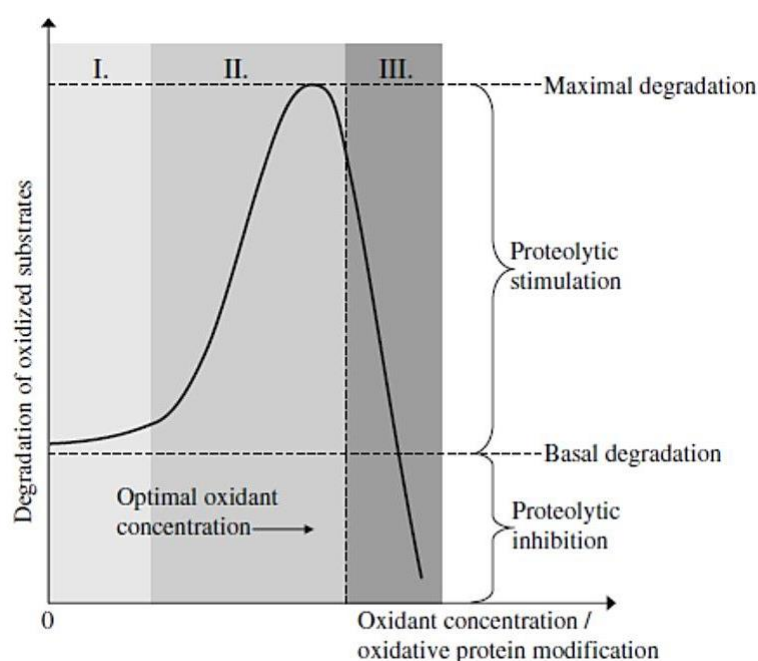
A avaliação dos grupos carbonilos fornece um resultado integrado do dano oxidativo (Stadtman et al., 2000). Por isso diversos procedimentos sensíveis para a detecção e quantificação de grupos carbonilos de proteínas têm sido desenvolvidos, a maioria dos quais emprega a derivatização com 2,4-dinitrofenol hidrazina e posterior imunodeteção da hidrazona resultante, utilizando anticorpos mono e policlonais, em ensaios de western blot ou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Rodney L. Levine, 2002). Também se tem usado a derivatização com biotina-hidrazida e a sua detecção com sondas fluorescentes (Moller et al., 2011).

#### 4. PROTEOSTASIA E SISTEMAS PROTEOLÍTICOS

O reconhecimento e degradação atempada de proteínas oxidadas de modo a evitar a sua acumulação em agregados de proteínas intensamente danificadas é importante para a sobrevivência celular (T. Grune et al., 2004). Para evitar a acumulação, geradora de proteínas não funcionais, as células contêm diferentes sistemas proteolíticos de depuração (Nowotny et al., 2014), dos quais o sistema proteassomal e a autofagia são os mais importantes (Jung et al., 2006; Rock et al., 1994).

##### 4.1 Suscetibilidade proteolítica após modificações oxidativas

A suscetibilidade das proteínas oxidadas à degradação proteolítica, pode ser explicada em três etapas distintas (Tobias Jung et al., 2009).



**FIGURA 3** – Suscetibilidade proteolítica de proteínas oxidativamente modificadas (T. Jung et al., 2009).

Segundo a **figura 3**, a primeira etapa (I) descreve o estado das proteínas enquanto estas estão ligeiramente oxidadas. Ainda que nesta fase a estrutura da proteína esteja intacta, as suas funções e atividades estão já diminuídas. Na segunda etapa (II) a continuação das modificações oxidativas causa o desdobramento da proteína, enquanto prossegue a sua perda funcional. O desdobramento da proteína provoca a exposição de estruturas hidrofóbicas, normalmente resguardadas no interior da proteína, que se tornam objeto de fácil reconhecimento pelo proteassoma, para posterior degradação (R. Shringarpure et al., 2001). As concentrações



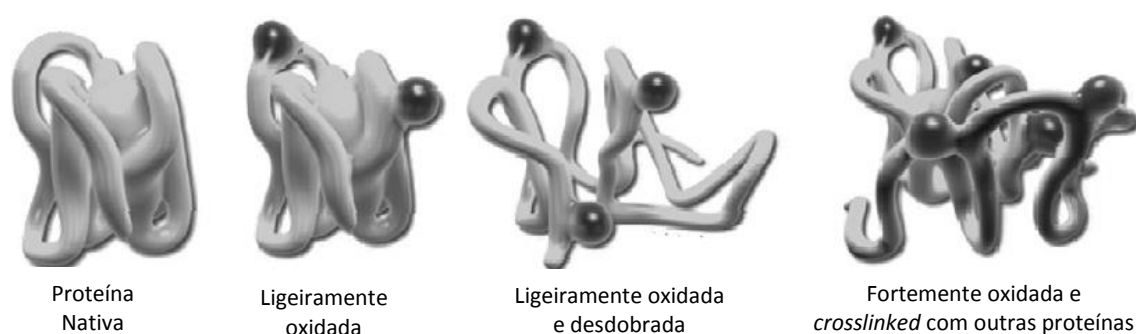
crescentes de oxidantes estão correlacionadas com a proteólise das proteínas por ativarem o proteassoma, e deste modo impedir a sua acumulação e manter a homeostasia celular. No entanto, se as proteínas forem sujeitas a exposição oxidativa adicional, poderá ocorrer *cross-linking* entre elas e causar agregação, ao que se segue uma queda na suscetibilidade proteolítica, e diminuição da degradação pelo proteassoma. Como consequência, poderá atingir-se a terceira etapa (III), de acumulação intracelular de agregados proteicos insolúveis (Nowotny et al., 2014).

#### 4.1.1. AGREGADOS PROTEICOS

Os agregados proteicos são complexos oligoméricos de proteínas enoveladas ou desdobradas. Estes complexos são essencialmente insolúveis, alteram o metabolismo celular e influenciam a sua atividade (Castro et al., 2012). O agregado não está relacionado com a função original da proteína, podendo até ser tóxico (Johnston et al., 1998).

Os agregados proteicos podem surgir da oxidação das proteínas através de reações com radicais livres (K. J. Davies, 1987; K. J. Davies et al., 1987). Foi proposto que na formação inicial dos agregados proteicos a interação é de forma não covalente e envolve fortes ligações hidrofóbicas e interações electrostáticas. Seguidamente, estes agregados tendem a formar ligações covalentes, devido a reações entre radicais carbono, oxigénio e nitrogénio e cadeias laterais de aminoácidos. Durante o processo de ligação covalente cruzada nos agregados proteicos, componentes não proteicos como hidratos de carbono e lípidos oxidados, também podem reagir, adicionar massa oxidada (T. Grune, 2000; Tilman Grune et al., 2003) e contribuir para o aumento do agregado.

A maior parte destas modificações oxidativas acompanha-se de mau funcionamento da proteína que se pode dever à alteração direta de domínios necessários ao seu funcionamento normal, ou a um desdobramento parcial (R. Shringarpure et al., 2001) (Bader et al., 2006). A proteína desdobrada expõe os seus segmentos hidrofóbicos e adquire as características estruturais que as suscetibilizam à degradação (**figura 4**) (Pacifi et al., 1991).



**FIGURA 4** – Aumento do dano oxidativo (T. Jung et al., 2007).

## 4.2 Proteassoma

Aproximadamente 70% a 90% das proteínas danificadas por enrolamento incorreto são degradadas no proteassoma. Estudos realizados ao longo dos anos sugerem que o sistema proteassomal degrada proteínas oxidadas no citoplasma, no núcleo e no retículo endoplasmático das células eucarióticas (Tilman Grune et al., 2003).

Proteases multicatalíticas como o proteassoma podem ser encontradas em todas as formas de vida (Wójcik et al., 2003), distribuídas no citosol, no núcleo e em ligação com o retículo endoplasmático ou outras membranas celulares (T. Grune et al., 2004).

O sistema proteassomal eucariótico consiste no proteassoma 20S, e em diferentes reguladores como o 11S e o 19S que se podem associar ao proteassoma 20S, conseguindo portanto alterar a atividade e a seletividade do processo (Volker et al., 2002). O proteassoma 20S inclui o núcleo catalítico, enquanto o proteassoma 26S é formado pela adição de duas subunidades reguladoras 19S para hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) e reconhecimento de poliubiquitina (Rivett, 1993). O sistema de ubiquitina-proteassoma geralmente depende do reconhecimento individual do substrato pelas ubiquitina ligases, da sua modificação pela conjugação com a ubiquitina e finalmente da sua degradação pelo proteassoma (Martens et al., 2015). No entanto se as células estiverem sujeitas a stresse oxidativo persistente, ocorre inibição parcial da atividade do 26S e há consequente acumulação de substratos ubiquitinados. A dissociação do 26S, liberta os complexos 20S, que logo adquire aumento da capacidade celular, independente de ATP/ubiquitina, para remover proteínas oxidadas (Hohn et al., 2014).

Trabalhos anteriores mostraram que células deficitárias no sistema de ubiquitinação, embora incapazes de ubiquitinar proteínas, mantêm intacta a capacidade para degradar proteínas oxidadas. Evidências em modelos *in vitro* de proteassoma 20S purificado demonstraram a degradação preferencial de proteínas oxidadas, independentemente da conjugação de ubiquitina e da presença de ATP (R. Shringarpure et al., 2003). Portanto, parece claro que o proteassoma 20S é responsável pela degradação de proteínas oxidadas, não ubiquitinadas (Tilman Grune et al., 2003).

### 4.2.1 DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS OXIDADAS PELO PROTEASSOMA 20S

O proteassoma 20S é um complexo em forma de barril (**figura 5**), constituído por quatro anéis homólogos ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ), cada um deles com sete subunidades distintas. Os anéis  $\alpha$  externos são responsáveis pela deteção do substrato a degradar e a ligação de complexos reguladores, tais como o 11S e 19S, que determinam a atividade e a especificidade do proteassoma. Após o contacto do substrato com os anéis  $\alpha$ , segue-se a interação com os três centros proteolíticos, a

subunidade  $\beta 1$  (atividade peptidásica semelhante a caspase), a subunidade  $\beta 2$  (atividade peptidásica semelhante à tripsina) e a subunidade  $\beta 5$  (atividade peptidásica semelhante à quimotripsina) (T. Jung et al., 2009). Esta estrutura é a parte central, proteolítica, do proteassoma, constituída ainda por vários ativadores, inibidores e moduladores da atividade proteassômica (Tobias Jung et al., 2007).



**FIGURA 5** – Estrutura e subunidades do proteassoma 20S (Tobias Jung et al., 2007).

Foi proposto que o desdobramento parcial e a exposição dos resíduos internos de aminoácidos hidrofóbicos é fundamental para a seletividade e o reconhecimento das proteínas oxidadas pelo proteassoma 20S (T. Grune et al., 2004; Tilman Grune et al., 2003; Reshma Shringarpure et al., 2002). Em circunstâncias oxidantes, como a carbonilação de proteínas, resulta perda de atividade do proteassoma 26S, mas a atividade do proteassoma 20S mantém-se praticamente inalterada, demonstrando maior resistência ao stresse oxidativo (Reinheckel et al., 1998).

Recentemente, inibidores do proteassoma têm sido testados para modular alterações nas células, tendo especial interesse em várias áreas de pesquisa, especialmente na terapêutica (Castro et al., 2012; Hu et al., 2014; T. Jung et al., 2009).

#### 4.3 Autofagia

Outro sistema fundamental na eliminação de proteínas e manutenção da homeostasia celular é a autofagia (derivado do grego que significa “comer a si mesmo”. Este sistema encontra-se em todas as células eucariontes e está evolutivamente conservado desde as leveduras até aos seres humanos (B. Levine et al., 2004). Atualmente, o processo é subdividido em três categorias: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia (Rubinsztein et al., 2011). A autofagia mediada por chaperonas é uma resposta secundária à falta de nutrientes e difere dos outros dois processos por envolver translocação direta de proteínas alvo através da membrana lisossomal por intermédio de uma chaperona, a *Heat Shock*

*Protein 70 (Hsp70)*. A microautofagia é um processo que leva a degradação de porções do citoplasma, por invaginações ou formação de septos da membrana lisossomal/vacuolar, que podem incluir organelos celulares (Klionsky, 2005).

A macroautofagia, a via que focamos neste trabalho (que será daqui em diante referida apenas como autofagia), é um processo catabólico que elimina agregados proteicos, organelos desnecessários ou danificados e até mesmo microrganismos como bactérias (Rajawat et al., 2009). Este mecanismo, para além de manter a homeostasia celular, também é fortemente induzido pela falta de nutrientes, o que leva à degradação em massa de componentes citoplasmáticos (proteínas, organelos), o que gera nutrientes e energia, os quais completam as necessidades das células em condições de escassez de recursos (Todde et al., 2009).

Este processo é caracterizado pela intrusão de uma parte do citoplasma para o interior de vesículas de dupla membrana denominadas autofagossomas. Subsequentemente, os autofagossomas fundem-se com lisossomas e originam o autofagolisossoma, cuja carga citoplasmática é degradada e os produtos resultantes são reciclados para a síntese de novas moléculas (Lee et al., 1994). De facto, os aminoácidos e outras moléculas geradas por degradação autofágica regressam ao citoplasma para a reciclagem ou a produção de energia (Noboru Mizushima et al., 2010). Embora os autofagossomas possuam alguma atividade hidrolítica, esta é por vezes insuficiente para completar a degradação proteolítica. Assim, a fusão dos autofagossomas com os lisossomas pode ser visto como imprescindível no processo de autofagia (Rajawat et al., 2009). Os lisossomas são organelos intracelulares rodeados por uma membrana e estão equipados com uma variedade de enzimas que incluem, as hidrolases, proteases, peptidases, lípases, glicosidades, nucleases, fosfatases e sulfatases. A maioria destas enzimas atua num pH ótimo entre 4,5-5,0 (Hohn et al., 2014).

À disfunção desta via têm sido associadas um número crescente de doenças humanas, tais como, doenças infecciosas, neurodegenerativas e cancro (Ravikumar et al., 2010).

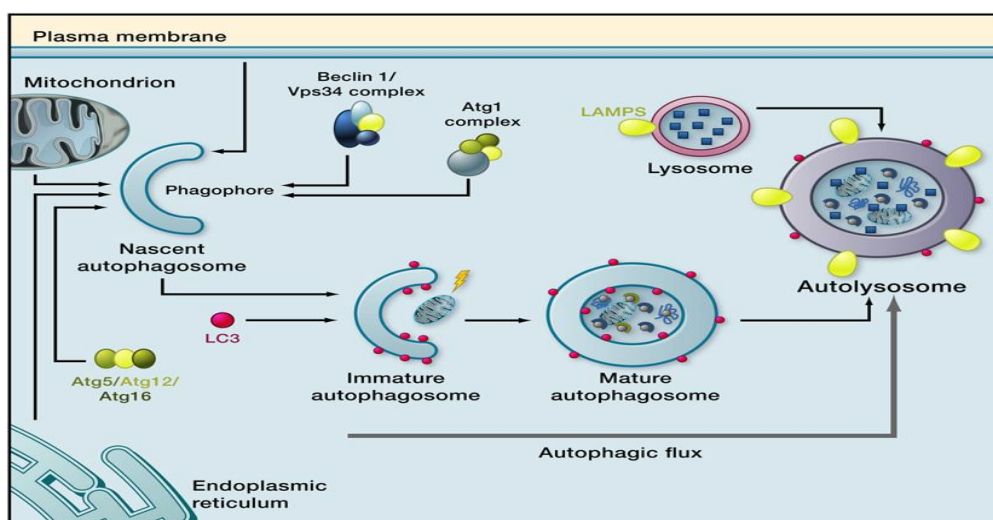
#### **4.3.1 MECANISMO MOLECULAR DA MACROAUTOFAGIA**

A macroautofagia é o processo mais extensamente estudado e, quantitativamente, a mais importante forma da autofagia (Rajawat et al., 2009). Esta via, que em praticamente todas as células tem uma atividade basal para manutenção da homeostasia, é rapidamente ativada quando as células necessitam de energia e nutrientes. Esta via é também ativada quando a célula se prepara para remodelações estruturais ou para se livrar de componentes prejudiciais, tais como os formados durante o stresse oxidativo, e infeções. O estado nutricional, fatores hormonais, acumulação de agregados, temperatura, concentração de oxigénio e consistência

celular são fatores importantes na regulação da autofagia (Maiuri et al., 2007; Mizushima et al., 2007; N. Mizushima et al., 2010).

Reconhecem-se diferentes eventos celulares durante a autofagia: nucleação da vesícula (formação da membrana de isolamento/fagóforo), seu alongamento e conclusão (crescimento e encerramento), fusão de autofagossoma de dupla membrana com o lisossoma (autofagolisossoma) e degradação do seu conteúdo, incluindo a membrana interna (Ravikumar et al., 2010; Rubinsztein et al., 2011).

A fonte, ou fontes, da membrana que origina os autofagossomas é ainda objeto de debate. Postula-se que os autofagossomas são gerados a partir de moléculas intracelulares preexistentes, ou surgir de membranas intracelulares já formadas, provenientes do retículo endoplasmático (RE) ou da membrana mitocondrial (**Figura 6**) quando os nutrientes faltam (Axe et al., 2008; Ravikumar et al., 2010).



**FIGURA 6** – Origens da membrana dupla, formação e maturação do autofagossoma (Rubinsztein et al., 2011).

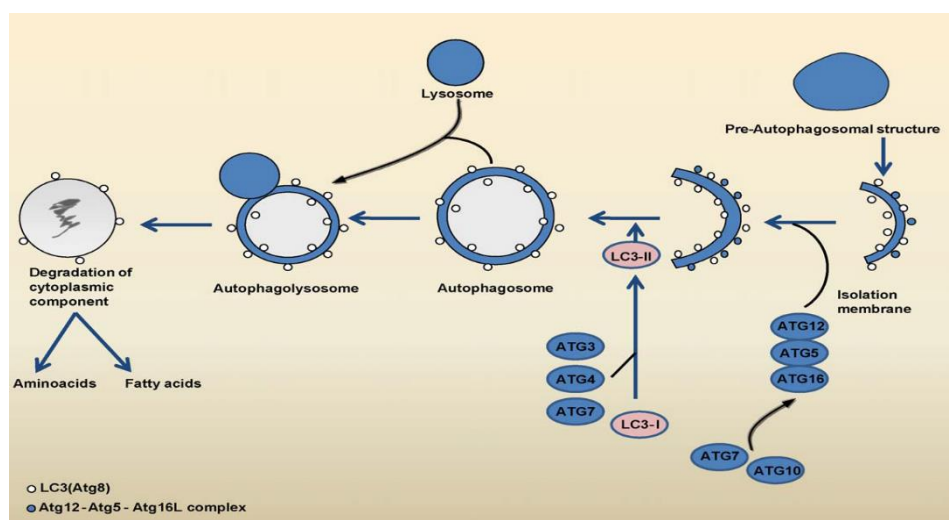
Para além do RE e da mitocôndria, tem ainda sido sugerido o complexo de Golgi, como fonte para a formação do fagóforo (van der Vaart et al., 2010).

A atividade da autofagia é rigorosamente controlada por várias vias de sinalização (B. Levine et al., 2008). Um dos principais reguladores é o mTOR (mammalian target of rapamycin), cínase com efeito inibidor na presença de fatores de crescimento e nutrientes. Para este processo são ainda vitais as moléculas de sinalização PI3K classe I / Akt (proteína cinase B), que se ligam a recetores tirosina/cínase, ativam mTOR e reprimem a autofagia em resposta à insulina e a outros fatores de crescimento semelhantes (Lum et al., 2005).

Para a formação do fagóforo (estrutura pré-autofagossomal) é requerida a intervenção da PI3K (phosphoinositide 3-kinase) Vps34, que atua num grande complexo macromolecular que

também contém atg6 (beclin 1), atg14 e Vps15 (p150) (Ravikumar et al., 2010; Salminen et al., 2009).

O alongamento do fagoforo está associado a duas reações de ubiquitinação. Na primeira reação o atg5 (autophagy related gene 5) é conjugado com o Atg12 pelo Atg7 (semelhante à enzima ativadora E1-ubiquitina) e depois transferidos para o Atg10 (semelhante à enzima de conjugação E2-ubiquitina). Posteriormente o conjugado Atg5-Atg12 interage não covalentemente com ATG16L1, o que leva a formação do complexo Atg5-Atg12-Atg16L1 que em seguida se liga aos fagoforos, mas deles se dissocia quando os autofagossomas ficam completamente formados (Rajawat et al., 2009). Na segunda reação, semelhante à ubiquitinação, a proteína LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) é conjugada com o lípido fosfatidiletanolamina (PE) por Atg7 (E1) e Atg3 (E2) para formar a LC3-II (Ravikumar et al., 2010). Esta conversão não é apenas um momento essencial na formação do autofagossoma, mas também representa um marco na detecção da autofagia. O LC3-II é orientado especificamente para o alongamento da membrana do autofagossoma e nele permanecerá até à sua conclusão e à fusão com os lisossomas, ao contrário do complexo Atg12-Atg5-Atg16L1. O LC3-II que está na face citoplasmática dos autofagolisossomas, pode ser depois deslipidado pela ação enzimática de Atg4 (**Figura 7**) e reciclado (Cecconi et al., 2008; Ravikumar et al., 2010).



**FIGURA 7** – Formação do autofagossoma e fusão lisossomal (Rajawat et al., 2009).

Curiosamente, LC3II é também capaz de se ligar à proteína adaptadora 1 (SQSTM1/p62), que medeia o reconhecimento e o seguimento dos agregados proteicos ubiquitinados para a degradação via autofagia seletiva (Hohn et al., 2014). A p62, para além de conduzir substratos ubiquitinados aos autofagossomas, também realiza essa tarefa para com o proteassoma (Y. Wang et al., 2013). Por isto, até mesmo os genes Atg têm intervenção via autofágica, o tal

significando que a sua sobreexpressão ou ablação, pode influenciar o processo de envelhecimento através de efeitos relacionados com a autofagia (Korolchuk et al., 2011).

#### 4.4 Cross-talk entre o proteassoma e autofagia

As células mantêm a proteostasia através da avaliação contínua da qualidade das suas proteínas (Wong et al., 2010). Estudos anteriores evidenciaram que a degradação por uso do proteassoma e a proteólise por a via lisossomal interligam-se através de um mecanismo de compensação (Ding et al., 2004).

A conexão entre os sistemas proteolíticos e os agregados proteicos tem sido questionada; vários estudos sugerem que o declínio das atividades proteolíticas se relaciona com a acumulação de proteínas danificadas e de agregados proteicos, características típicas do envelhecimento. A inibição do proteassoma conduz à indução da autofagia, e este efeito pode proteger as células de morte induzida aquando dessa inibição (Hohn et al., 2013). Assim a autofagia funcionaria como um mecanismo compensatório, que erradica proteínas potencialmente tóxicas que resistiram à degradação proteassomal (Driscoll et al., 2012).

O sistema de ubiquitinação celular especifica se a proteína será transferida para o proteassoma ou o autofagossoma, para posterior reciclagem. Exemplo disso são as proteínas com cadeias de poliubiquitina em Lys48, que são direcionadas para a degradação proteossómica. Por outro lado, proteínas com uma única ubiquitina ou cadeias poliubiquitinadas em outros resíduos Lys, são direcionadas para os autofagossomas (Wooten et al., 2008). Algumas proteínas podem ser direcionadas tanto para o proteassoma como para as vesículas autofágicas. A degradação das proteínas através do proteassoma ou por autofagia é, em última análise, determinada através da competição para ligação a proteínas adaptadoras, como é a proteína p62, que pode direcionar as proteínas a ambas as vias de degradação (Ye et al., 2005). A proteína p62 tem maior afinidade para proteínas monoubiquitinadas e poliubiquitinadas em Lys63, direcionadas à degradação pela autofagia, mas também é capaz de reconhecer proteínas poliubiquitinadas em Lys48, a degradar no proteassoma (Wooten et al., 2008). Tal sugere que em momentos de sobrecarga ou disfunção do proteassoma, o aumento da expressão de p62 promove o direcionamento de proteínas poliubiquitinadas em Lys48 para o autofagossoma (Benbrook et al., 2012).

A interação entre estes dois sistemas pode existir a outros níveis cujo significado se afigura como um código, a decifrar. A sua compreensão e modulação poderá, no futuro, ajudar a manter a proteostasia celular e contribuir para retardar processos involutivos como o envelhecimento e os efeitos daí resultantes.

Em trabalho prévio, foi verificado que a inibição do proteassoma em células Jurkat, depois do tratamento com  $H_2O_2$ , favorecia a formação de agregados (Castro et al., 2012) e, após inibição do proteassoma, havia ativação da via autofágica (Castro et al., manuscrito em preparação). Conhecido um mecanismo compensador da inibição do proteassoma, decidimos tirar partido desse modelo de stresse oxidativo e perceber a reação de proteínas intervenientes na autofagia em tais condições. Paralelamente ao stresse oxidativo, tentamos modular estas duas vias, que mantêm a proteostasia celular, através de inibidores, para perceber alterações proteicas decorrentes e possíveis mecanismos de compensação.

Neste âmbito, admite-se como hipótese que a indução atempada da autofagia previne a acumulação de proteínas oxidadas e agregados. Para a abordar, procedeu-se à sobreexpressão da proteína LC3B que, de entre as três isoformas da LC3 (LC3-A, LC3B e LC3-C) é a mais amplamente usada em experiências (N. Mizushima et al., 2010). Sendo a proteína LC3 um marcador de autofagossomas, presente no alongamento do fagoforo, admitiu-se também que a sua sobreexpressão anteciparia a autofagia em condições de stresse e torná-la-ia mais rápida.



## 5 OBJETIVO

- Através da análise da expressão das proteínas intervenientes na autofagia, LC3, p62 e Atg5, em paralelo com a análise de proteínas oxidadas, confirmar a existência da indução da autofagia aquando da inibição do proteassoma.
- Averiguar da existência, através da expressão das mesmas proteínas, de um mecanismo compensatório de indução do proteassoma aquando da inibição da autofagia, simultaneamente a estímulos oxidativos.
- Perceber se a sobreexpressão da proteína LC3B antecipa a ativação da autofagia e previne a acumulação de proteínas oxidadas sobre a forma de agregados.

# **M**ATERIAL E **M**ÉTODOS

## 1. CULTURA DE CÉLULAS

### 1.1 Células Jurkat

Células Jurkat foram mantidas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% glutamina e 1% penicilina/streptomicina e incubadas à temperatura constante de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) numa incubadora (*Forma®Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> incubators, Thermo Scientific*). Uma hora e dezoito horas antes das experiências, foram preparadas placas de 6 poços contendo 6x10<sup>5</sup> células/mL, duas das quais foram tratadas, respetivamente, com 2,5µM de lactacistina, inibidor do proteassoma, e 1mM de 3-Metiladenina (3-MA; Calbiochem) inibidor de macroautofagia, gentilmente oferecido pela Professora Helena Vasconcelos do (IPATIMUP). Outras células foram preparadas em placas de 6 poços imediatamente antes de serem colocadas sob stresse oxidativo durante 3 e 24 horas.

De seguida, as células previamente tratadas foram submetidas a oxidação com 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 horas. A seleção das concentrações foi baseada em experiências anteriores realizadas para otimizar a concentração de lactacistina (dados não mostrados) e em elementos constantes da ficha de dados da 3-MA fornecido pelo fabricante.

A quantificação da proliferação e viabilidade celular foram avaliadas com recurso ao contador automático de células (Invitrogen) e o número de 6 x 10<sup>5</sup> células/ml acertado no início das experiências.

### 1.2 Células HeLa

Células HeLa foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham F-12 medium* (DMEM-F12), suplementadas com 10% de FBS, a combinação de dois antibióticos 1% de penicilina/estreptomicina e incubadas à temperatura constante de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A transfeção transiente foi feita com pcDNA3.1 hLC3-mCerry usando a Lipofectamina® LTX Reagent (Invitrogen) e seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Sucederam-se transfeções com, 0,4µg, 0,5µg e 1,5 µg, a fim de perceber qual a melhor condição para obter maior porção de células transfetadas. Após avaliação citoquímica, por visualização no microscópio de fluorescência, verificou-se que a transfeção de 0,4µg de DNA apresentava maior eficiência (maior número de células transfetadas), razão por que foi usada nos trabalhos subsequentes.

As células foram preparadas em placas de 24 poços de maneira a estarem entre 50% e 80% de confluência na altura da transfeção. Decorridas 18 horas após a transfeção, as células foram incubadas com 100µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 3 e 24 horas.

### 1.3 Viabilidade celular

As células HeLa foram submetidas a um tratamento oxidativo, adicionando 100, 150, 200, 250 e 500µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de Hidrogénio) durante 3 e 24 horas, numa placa de 96 poços (Corning). Após os tratamentos, removeu-se o meio de cultura, lavaram-se as células em PBS e adicionou-se a cada poço 200µl de vermelho neutro (previamente preparado e diluído em meio completo – 402,44 µg/mL). Depois da incubação durante duas horas a 37°C, as células foram lavadas em PBS a 0,1M e posteriormente adicionaram-se 150µl de etanol a 50% contendo 1% (v/v) de ácido acético. A absorvância foi medida a 540nm usando uma microplaca de 96 poços (Infinite® 200-TECAN).

O mesmo protocolo foi seguido para a transfeção transiente das células HeLa, para que expressassem LC3B-mCherry sob efeito oxidativo (100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ao mesmo tempo, foram medidas as absorvâncias de células sem qualquer tratamento, usados como controlo.

## 2. PROCESSAMENTO DO PLASMÍDEO

### 2.1 Extração do plasmídeo

Bactérias contendo o plasmídeo pcDNA3.1 hLC3B-mCherry (Addgene) foram repicadas para uma placa de Petri com meio Luria Bertani Broth Agar (LB agar/agar) (Tryptona 10 g/L, extracto de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar/agar 15g/L e pH≈7,08 (Sigma)) e 50 µg/ml ampicilina (Biochrom), utilizando um espalhador esterilizado, e realizando todo o processo à chama. Incubaram-se as placas de Petri invertidas, numa estufa a 37° C durante 18-24h. O antibiótico permitiu selecionar bactérias que continham o pcDNA3.1 hLC3B-mCherry através do gene de resistência contido no plasmídeo. Repicou-se uma colónia da placa de petri, à chama, para um matraz autoclavado com meio de cultura liquido, LB com ampicilina. O matraz ficou durante 16h a 37°C (em agitação a 200rpm), para o crescimento das bactérias em cultura.

### 2.2 Purificação e quantificação do plasmídeo

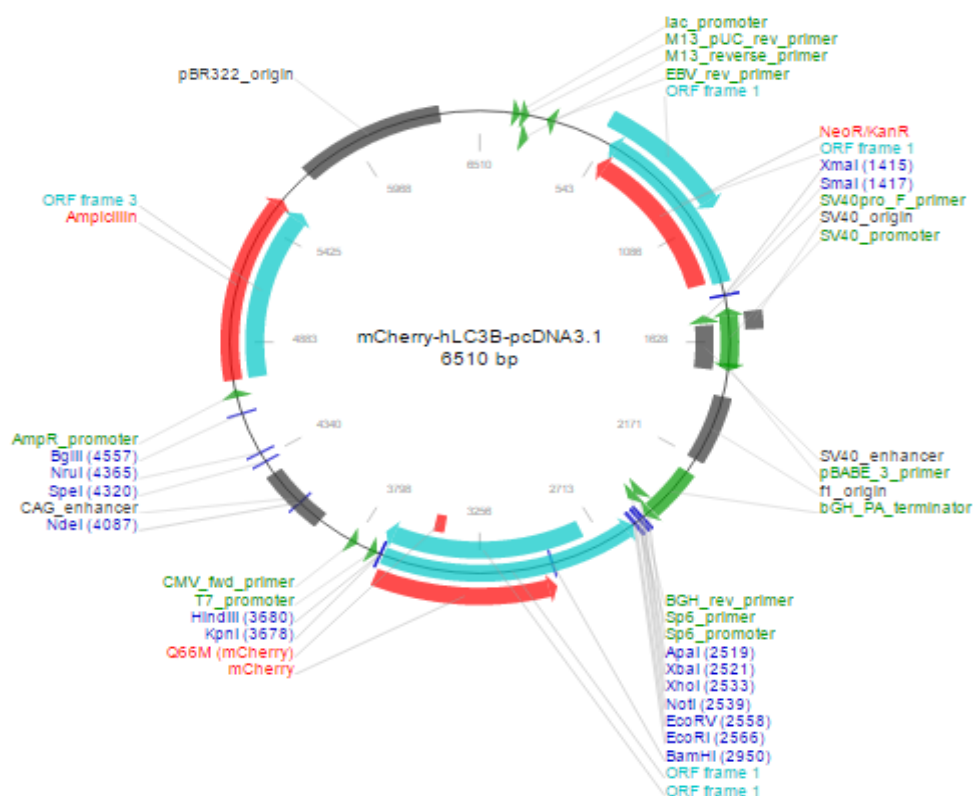
O isolamento do plasmídeo puro pcDNA3.1 hLC3B-mCherry foi realizado através da utilização do kit Hi Pure Plasmid Midiprep (Invitrogen). Centrifugou-se o meio de cultura das bactérias competentes *E.Coli*, durante 10 minutos a 4000g e removeu-se o sobrenadante. Ao *pellet*, adicionaram-se 0.4ml de tampão de ressuspensão (R3) até ficar visivelmente homogéneo (vortex). De seguida, adicionaram-se 0,4ml de tampão de lise (L7). Misturou-se gentilmente por inversão e deixou-se incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente adicionaram-se 0,4ml de tampão de precipitação (N3) e misturou-se por inversão até ficar homogéneo. O lisado foi centrifugado a 12,000g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Verteu-se o sobrenadante para a coluna, previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (EQ1), com uma pipeta e deixou-se filtrar pela ação da força da gravidade. O tubo foi descartado após terem sido, por duas vezes, adicionados 2,5ml de tampão de lavagem (W8) para a coluna. Adicionaram-se 0,9ml de tampão de eluição (E4) à coluna, que foi colocada previamente sobre um tubo estéril, que recebeu o DNA purificado. Adicionaram-se 0.63ml de isopropanol ao eluído e centrifugou-se a 12,000g durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1ml de etanol a 70% ao *pellet*. O tubo foi novamente centrifugado a 12,000g durante 5 minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e deixou-se secar o pellet ao ar durante 10 minutos. O DNA purificado foi ressuspendido em 50µl de tampão TE. Antes de ser armazenado a -20°C, o DNA foi quantificado através da leitura espectrofotométrica no Nanodrop

(Nanodrop™ ND-1000 software 13.3.0, na razão da absorvância a 260nm e 280nm, sendo geralmente considerado como puro com um rácio de  $\approx 1,8$ ).

O DNA plasmídico obtido, foi testado posteriormente em células HeLa.

### 2.3 Confirmação do plasmídeo

Para confirmar que se tratava realmente do plasmídeo pcDNA3.1 hLC3B-mCherry foram realizadas digestões duplas do DNA com enzimas de restrição. A primeira digestão foi feita com as enzimas BamHI, EcoRI, H<sub>2</sub>O, em tampão 10x BamHI e duas concentrações diferentes de DNA (1µg/µl e 2µg/µl), e a segunda com KpnI, EcoRI seguindo o mesmo procedimento, mas com o tampão 10x EcoRI, num volume final de 20µl em cada uma das digestões. As instruções foram seguidas de acordo com o DoubleDigest Calculator—Thermo Scientific. O DoubleDigest calcula o tampão mais adequado para a reação, concentração enzimática e as condições de incubação, assim como outros aditivos necessários para a dupla digestão. Incubaram-se as reações a 37°C num Thermomixer (Eppendorf®) durante 60 minutos.



**FIGURA 8** - Estrutura do plasmídeo pcDNA3.1 hLC3B-mCherry.

#### 2.4 Gel de agarose - eletroforese

Preparou-se 1% de agarose em TAE 1x (tampão Tris-Acetato-EDTA) e aqueceu-se durante 3 minutos num microondas, agitando posteriormente, até ficar totalmente dissolvida. Após ter sido vertida a solução num suporte, acrescentaram-se 0,5µl de *greensafe* (Nzytech Greensafe Premium) homogeneizado com a ponta da micropipeta. Após a solidificação do gel, carregaram-se 6µl em cada poço, contendo: 1µl de amostra da digestão, 1µl de *Loading dye* 6x e 4µl de H<sub>2</sub>O.

A digestão enzimática originou o aparecimento de duas bandas.

### 3. ANÁLISE MOLECULAR

O equipamento utilizado durante o procedimento experimental foi adquirido à BioRad®, e os reagentes à Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos da América), excepto quando indicado o contrário.

#### 3.1 Preparação das amostras para SDS-PAGE

As células, Jurkat e HeLa, foram lavadas com PBS arrefecido e solubilizadas em solução de lise (0,1% Triton, 20 mM NaCl, 30mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA e 100 mM DTT). Os lisados foram sonicados (BioRuptor) e a concentração das proteínas foi determinada através da quantificação pelo uso do método de Bradford (Bradford, MM., 1976). A leitura da absorvância foi efetuada a 595nm num leitor de placas (Infinite M200, TECAN). As amostras para análise eletroforética foram preparadas com 10 µg (jurkat) e 7µg (HeLa) de proteína total de cada extrato, ao qual se adicionou ¼ do volume final de GLB (gel loading buffer) (200mM Tris pH8,8; 40% v/v glicerol; 2% p/v SDS; 8mM EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e 0,4% p/v de azul bromofenol) a partir de uma solução *stock* de GLB 4x e 1:10 (v/v) de 1M DTT (ditiotretitol), completando o volume até 20µl com água. As amostras foram de seguida aquecidas a 65°C durante 20 minutos e 95°C durante 5 minutos num Thermomixer com agitação a 900 rpm. Após desnaturação e uma centrifugação rápida, as amostras foram utilizadas para o estudo eletroforético.

#### 3.2 SDS-PAGE

Realizou-se uma eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), usando um sistema descontínuo de géis, composto por um gel de empacotamento preparado com acrilamida numa concentração de 5% (p/v) e um gel de separação com 14% (p/v) de acrilamida (Cleveland et al., 1977), permitindo a separação das proteínas dos homogeneizados por diferentes pesos moleculares. A separação foi realizada em solução tampão Laemmli (tris-HCl 25mM, 0,1% p/v SDS e 250mM glicina), numa tina da BioRad®, durante aproximadamente 80 minutos à temperatura ambiente, e com aplicação de uma corrente elétrica constante de 25mA por gel.

#### 3.3 Western Blotting

Posteriormente à separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45µm em tampão de transferência (48mM Tris-HCl, 39mM Glicina,



0,037% p/v SDS e 20% v/v de metanol) sendo aplicada uma diferença de potencial de 30V durante 90 minutos. Para confirmar a eficiência da transferência a membrana foi corada com uma solução de *Ponceau S*, sendo posteriormente lavada com água destilada e incubada com uma solução de bloqueio constituída por 5% (p/v) de leite em pó sem gordura Molico® em TBS com 0,1% (v/v) Tween-20 (20mM Tris, 140mM NaCl, pH 7,6) TBST, durante 1h à temperatura ambiente, de maneira a bloquear as ligações não específicas na membrana de nitrocelulose. Em seguida a membrana foi cortada conforme os pesos moleculares das proteínas a detetar, e incubadas com diferentes anticorpos, diluídos na solução de bloqueio, durante a noite com a agitação a 4°C. A incubação foi feita em anticorpo primário policlonal de coelho anti-LC3 (Novus Biol), numa diluição de 1:2500, anti-p62 (Sigma) e anticorpo monoclonal de coelho anti-Atg5 numa diluição de 1:1000. Procedeu-se em seguida à lavagem da membrana em TBST, durante 5 minutos, repetindo por quatro vezes, e à incubação com a solução de anticorpo secundário anti-coelho diluído 1:5000 (Jackson ImmunoResearch) em solução de bloqueio, durante uma hora à temperatura ambiente com agitação. Em seguida, realizaram-se 4 lavagens com TBST durante 5 minutos cada. As bandas foram reveladas através da aplicação do substrato quimioluminescente para a peroxidase (BioRad, Clarity Western ECL SUBS) durante 5 minutos, seguida da deteção de sinal no equipamento Chemidoc.

A quantificação da densidade das bandas obtidas após Western Blotting foi realizada utilizando o software *ImageLab*.

### 3.4 Oxyblot

Para pesquisa de proteínas carboniladas após a transferência eletroforética as membranas de nitrocelulose foram colocadas numa solução de equilíbrio (0,1M TBS com 20% (v/v) de metanol durante 5 minutos. A membrana foi posteriormente lavada numa solução aquosa de 10% (v/v) de TFA (ácido trifluoroacético) durante 10 minutos. Seguidamente, foi colocada numa solução de 10mM de DNPH (2,4- Dinitrofenilhidrazina) em 10% (v/v) de TFA durante 10 minutos, em agitação, no escuro. Seguiram-se 5 lavagens de 5 minutos cada em solução aquosa com 10% (v/v) de TFA, uma lavagem em solução aquosa com 50% (v/v) de metanol e, finalmente, uma lavagem em 0,1M TBS.

A membrana foi depois incubada em solução de bloqueio constituída por 5% BSA (p/v) em TBS.T durante 1 hora à temperatura ambiente, e em seguida incubada numa solução de anticorpo primário policlonal de coelho anti-DNP (Dinitrofenilhidrazona) (Sigma) diluído 1:5000 (v/v) em solução de bloqueio, durante a noite a 4°C e com agitação continua. Após várias

lavagens de 5 minutos em 0,1% (v/v) Tween-20 em TBS (20mM tris, 140mM NaCl, pH 7,6), a membrana foi incubada em anticorpo secundário anti-coelho diluído 1:5000 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora no escuro. Seguiram-se 5 lavagens de 5 minutos cada, em TBS.T, mantendo a membrana no escuro. Por fim as bandas foram reveladas por quimioluminescência no equipamento Chemidoc.

#### 4. IMUNOCITOQUÍMICA

As células HeLa transientemente transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherry, cresceram em lamelas presentes no interior das placas de 24 poços. Após os tratamentos, referidos no subcapítulo 5.2, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído durante 20 minutos. De seguida, as células foram lavadas com PBS 0,1M e posteriormente permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 e bloqueadas com 5% de BSA, durante 5 minutos. As células foram incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-p62 (numa diluição de 1:1000) durante a noite a 4°C. Posteriormente incubou-se a membrana com o anticorpo secundário Alexa 568 (Molecular Probes). O núcleo foi marcado com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e as imagens foram capturadas com o equipamento ApoTome fluorescence microscope (Zeiss).

#### 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Salvo indicação em contrário, todos os resultados quantitativos são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão para a média (SEM). Utilizou-se o teste  $t$  para a análise comparativa das variáveis estudadas, considerando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

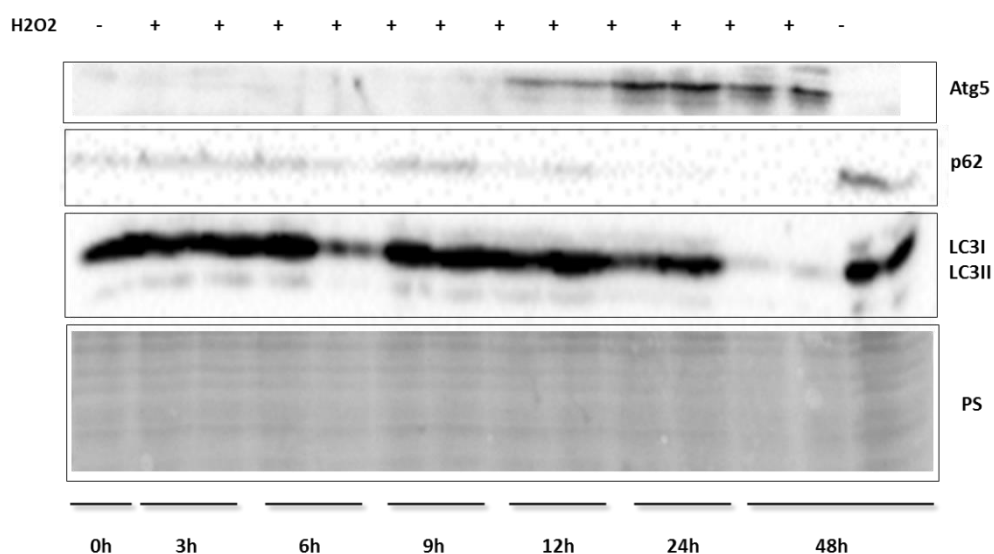
# **R**ESULTADOS

## 1. EXPRESSÃO DE MARCADORES INTERVENIENTES NA AUTOFAGIA

### 1.1 Cinética da marcação sob stresse

Em estudos prévios, foi verificado que submetendo a linha celular Jurkat a stresse oxidativo com peróxido de hidrogénio, resultava inibição do proteossoma, formação de agregados de proteínas oxidadas e diminuição da proliferação celular (Castro et al., 2012), características já encontradas em células T envelhecidas (Das et al., 2007; Ponnappan et al., 1999), tanto *in vivo* como *in vitro*. No mesmo modelo celular, sob stresse oxidativo, verificou-se também que havia ativação da macroautofagia (Castro et al., manuscrito em publicação).

Para colher elementos acerca da cinética desse processo ao longo do tempo, células Jurkat foram submetidas a stresse oxidativo com 100  $\mu$ M de peróxido de hidrogénio durante 48 horas, tendo como termo de comparação os controlos às 0 horas e 48 horas, sem o estímulo oxidante. Foram recolhidas amostras em duplicado às 3h, 6h, 9h, 12h, 24h e 48h (**figura 9**).



**FIGURA 9** – Expressão de marcadores de autofagia (Atg5, p62 e LC3) em células Jurkat submetidas a stresse oxidativo (100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em diversos tempos, ao longo de 48 horas, e controlo (-). LC3 é LC3I e LC3II; PS: Ponceau S.

Utilizando a técnica Western Blotting (WB), foram pesquisadas importantes proteínas da autofagia, a saber, a Atg5 (32kDa), a p62 (62kDa), e a LC3I (18kDa) e LC3II (16kDa).

Verificou-se aumento de expressão da proteína Atg5 a partir das 12 horas (**figura 9**). Em contraste, a expressão da proteína p62 estava diminuída a partir desse tempo. Relativamente à proteína LC3 verificamos que a sua expressão até às 12 horas se mantinha semelhante, mas a partir de 24 horas exibia decréscimo na quantidade de LC3-II e LC3-I.

Às 48 horas, nos extratos de células tratadas com  $H_2O_2$ , houve diminuição de expressão de todas as proteínas, o que pode significar menor viabilidade celular, pela falta de nutrientes e pelo stresse induzido anteriormente. Em contrapartida, no controlo às 48 horas, as proteínas mantiveram níveis idênticos ao controlo inicial.

Após os resultados desta experiência, escolhemos dois tempos distintos, 3 e 24 horas, para a recolha dos extratos, por serem dois tempos afastados e com claras diferenças na expressão de proteínas.

### 1.2 Efeito de inibidores

Posteriormente, realizamos as mesmas experiências mas com a adição prévia de inibidores do proteassoma (lactacistina, administrada 1 hora antes do stresse) e de autofagia (3-Metiladenina, 3MA, administrada 18 horas antes).

Empregando a técnica Western Blot e os tempos 0, 3 e 24 horas, obtiveram-se os resultados apresentados na **figura 10**.

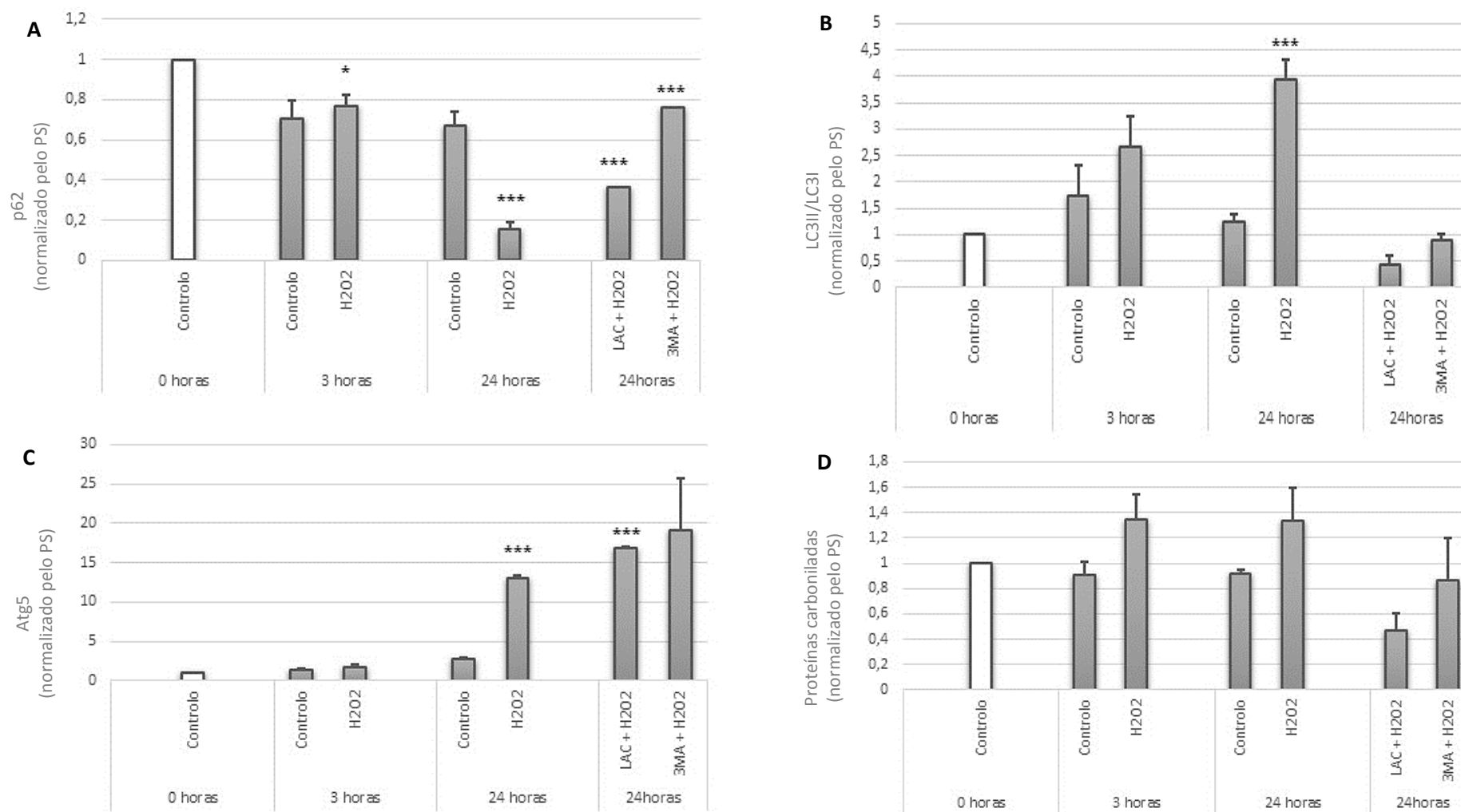
Em relação à proteína p62 (figura 10 – **A**), houve uma diminuição significativa, tanto às 3h (\* $P < 0,05$ ) como às 24h (\*\* $P < 0,01$ ) em condições com peróxido de hidrogénio. Às 24h houve diminuição significativa (\*\*\* $P < 0,001$ ) em ambas as condições com os inibidores.

Contrariamente à proteína p62, a proteína LC3 (rácio LC3II/LC3I) teve aumento significativo (\*\*\* $P < 0,001$ ) às 24h com peróxido de hidrogénio. O uso prévio de inibidores motivou às 24h, uma redução da proteína, mais acentuada na condição com lactacistina (figura 10 – **B**).

Às 24h, a proteína Atg5 (figura 10 – **C**) também aumentou os seus níveis, até mesmo após administração dos inibidores, exibindo um aumento significativo (\*\*\* $P < 0,001$ ) às 24h com peróxido e às 24h com o inibidor do proteossoma e peróxido de hidrogénio.

### 1.3 Quantificação de carbonilos

Surgindo os grupos carbonilo a partir de uma multiplicidade de processos oxidativos, a sua deteção fornece uma informação geral ou integrada do dano oxidativo (Stadtman et al., 2000). O estudo mostrou aumento de proteínas carboniladas durante as 24h nas condições que continham peróxido de hidrogénio, exceto nas condições em que também tinham



**FIGURA 10 - Marcadores proteicos de autofagia (A,B E C) e proteínas carboniladas (D), após 3h e 24h de stress oxidativo (100 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) quantificados por densitometria de bandas após Western blotting.**

**A:** Proteína p62. **B:** Proteína LC3II/LC3I. **C:** Proteína Atg5. **D:** Proteínas carboniladas. Os resultados foram normalizados usando a densidade das bandas no papel de nitrocelulose corado com Ponceau S.. Dados correspondem à média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, com os dados provenientes da situação controlo 0 horas definidos como sendo 1 (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001; )segundo o teste t de student bicaudal).

presente os inibidores. No entanto a diminuição de carbonilos na condição de inibição com lactacistina (figura 10 – **D**) foi maior que com a utilização de 3-MA.

Na condição 3-MA há aumento de proteínas carboniladas, em relação à condição com lactacistina, mas em grandeza inferior comparativamente às 0 horas.



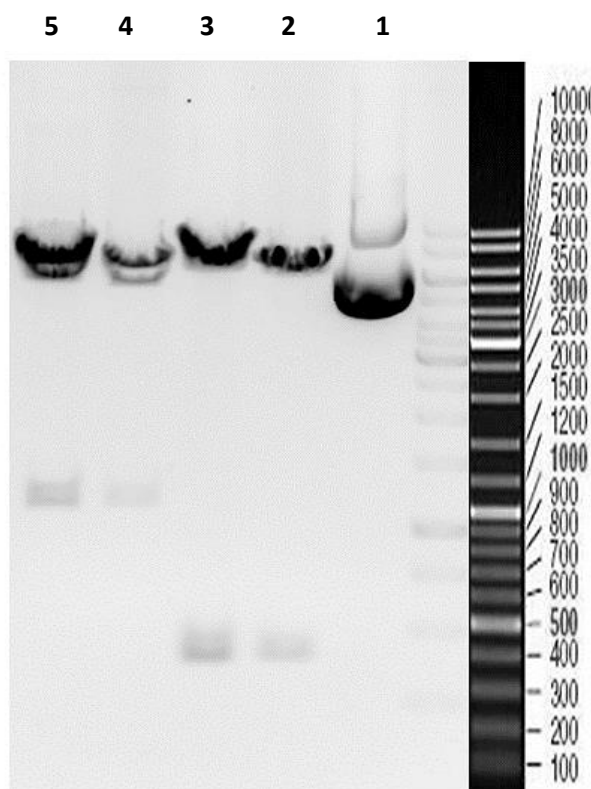
## 2. ATIVAÇÃO DA AUTOFAGIA

Acredita-se que a sobreexpressão da LC3B-mCherry anteciparia a ativação da autofagia e preveniria a acumulação de proteínas oxidadas ou agregados.

Para a ativação da macroautofagia foi primeiro necessário caracterizar o plasmídeo, pcDNA3.1 hLC3B-mCherry, e para isso procedemos à sua extração, purificação, quantificação e confirmação.

A confirmação foi realizada em gel de agarose na presença do plasmídeo após digestão enzimática empregando diferentes enzimas de restrição (**figura 11**).

Após as digestões, encontramos duas bandas no gel, já esperadas pois estas enzimas digerem o plasmídeo em dois locais específicos. Através da digestão com as enzimas BamHI e EcoRI, seria de esperar duas bandas com 6126bp e 384bp (**figura 11 - 2 e 3**) e com a KpnI e EcoRI seria de esperar duas bandas com 5398bp e 1112bp (**figura 11 - 4 e 5**). Como podemos verificar pela **figura 11**, essas bandas foram comparadas com as do *Generuler™ DNA ladder*, e verificou-se que apresentavam os pesos esperados.



**FIGURA 11 - Plasmídeo pcDNA3.1 hLC3B-mCherry verificado por eletroforese em gel de agarose.**

**1** – Plasmídeo sem digestão. **2** – 1µg/µl de DNA digerido com BamHI e EcoRI. **3** – 2µg/µl de DNA digerido com BamHI e EcoRI. **4** – 1µg/µl de DNA digerido com KpnI e EcoRI. **5** – 2µg/µl de DNA digerido com KpnI e EcoRI.

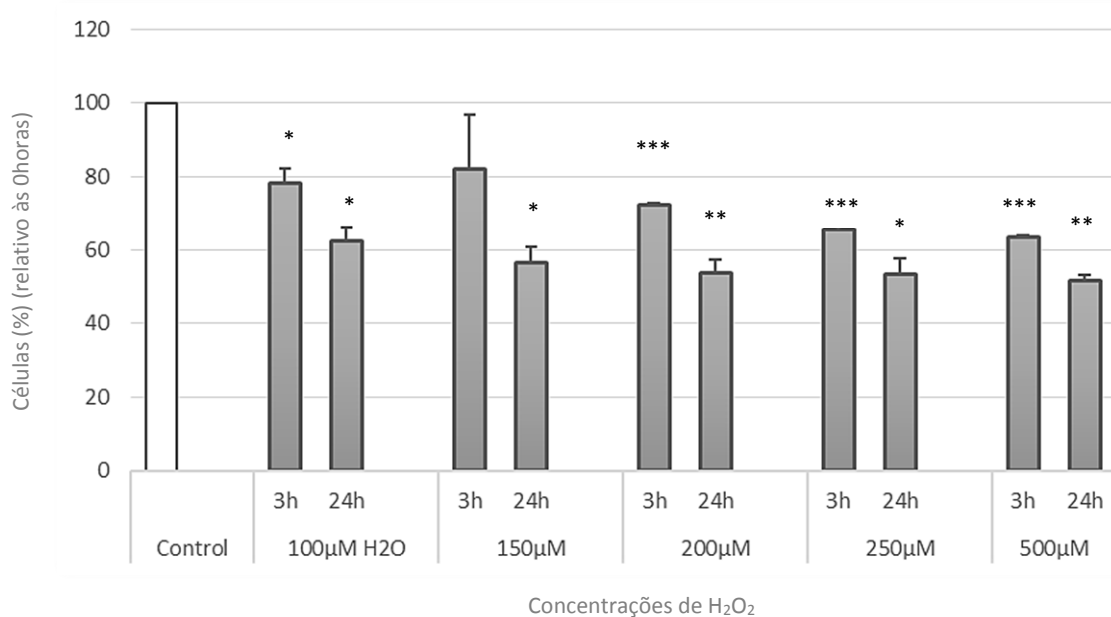
### 3. OPTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA A TRANSFETAR PARA SOBREEXPRESSÃO DA AUTOFAGIA

Subsequentemente à confirmação do plasmídeo e à transfeção das células Jurkat, seguindo um protocolo proposto pelo fabricante, verificou-se que este era ineficaz. Para perceber se o problema seria do plasmídeo, tentamos transfetar outra linha celular, as células HeLa. Após a utilização de 0,4µg, 0,5µg e 1,5µg de DNA para avaliação da melhor condição, pela visualização no microscópio de fluorescência, elegeu-se a de 0,4µg. Tendo em conta a dificuldade na transfeção das células Jurkat, foi decidido continuar com as células HeLa por apresentarem melhores taxas de sucesso.

#### 4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O teste do vermelho neutro (NR) baseia-se na capacidade das células viáveis incorporarem o corante ao nível dos lisossomas. Uma vez que o NR é um corante catiónico fraco, penetra rapidamente as células através das membranas celulares por difusão não iónica e é aprisionado nos lisossomas devido ao seu conteúdo ácido. Alterações na membrana lisossomal resultam numa redução da incorporação do NR, podendo-se assim distinguir entre células viáveis (incorporam NR, maior absorvância) e inviáveis (não incorporam NR, menor absorvância).

As células HeLa foram submetidas a diferentes concentrações de peróxido hidrogénio, por diferentes tempos, cujos resultados podem ser visualizados na **figura 12**. Notou-se perda significativa viabilidade às 3 horas e às 24 horas em todas as condições, exceto às 3h na concentração de 150µM. Visto que às 24h a única condição que não perdia mais de 40% de viabilidade ser a da concentração de 100µM, foi esta selecionada para subseqüentes experiências.

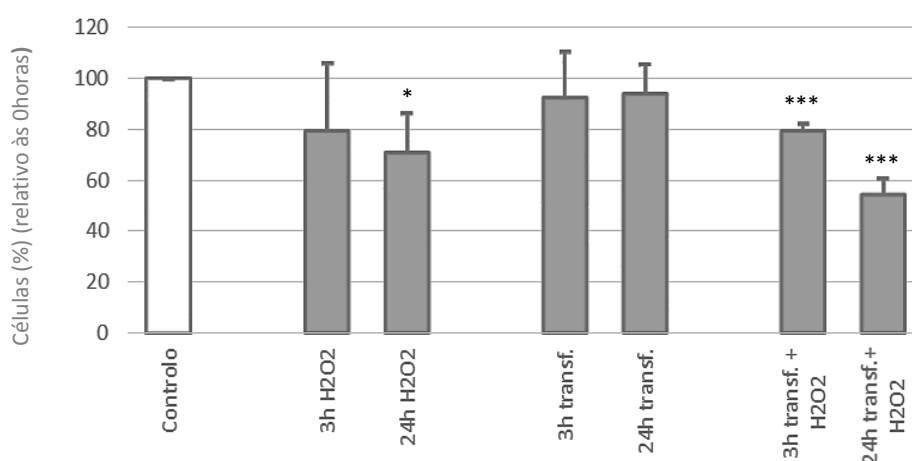


**FIGURA 12 - Ensaio de viabilidade das células HeLa sob efeito de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Considerou-se 100% a absorvância das células às 0h, sem qualquer estímulo. Dados correspondem à média ± SEM de três ensaios independentes e para cada condição as células foram plaqueadas em triplicados, com os dados provenientes da situação controlo definidos como sendo 100% (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, segundo o teste t de student bicaudal).

Um procedimento similar limitado à concentração de 100 $\mu$ M, foi seguido para avaliar a viabilidade de células HeLa transfetadas transientemente.

As células foram mantidas em cultura durante 3 e 24 horas em três condições diferentes, uma em que apenas eram tratadas com 100 $\mu$ M de peróxido de hidrogénio, outra em que somente eram transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherry e por fim transfetadas com 100 $\mu$ M de peróxido de hidrogénio.

Em atenção aos resultados constantes da **figura 13**, podemos verificar que não houve perda significativa de viabilidade nas células transfetadas, mantendo um valor superior a 90%, tanto às 3 como às 24 horas. Este resultado indica que a transfeção não afetou a viabilidade celular nas condições utilizadas. As células submetidas a transfeção e stresse oxidativo mostraram perda de viabilidade significativa (\*\*P<0,001) às 3 e às 24 horas, superior a 40% neste ultimo tempo.



**FIGURA 13 - Ensaio de viabilidade de células HeLa transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherry sem stresse ou sob stresse com 100 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 3 e 24 horas.**

Considerou-se 100% a absorvância das células às 0 horas (controlo) sem qualquer estímulo. Dados correspondem à média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes e para cada condição as células foram plaqueadas em triplicados, com os dados provenientes da situação controlo definidos como sendo 1 (\*P<0.05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, segundo o teste t de student bicaudal).

## 5. EFEITO DA TRANSFEÇÃO CELULAR NAS PROTEÍNAS INTERVENIENTES NA AUTOFAGIA

### 5.1 Marcadores de autofagia

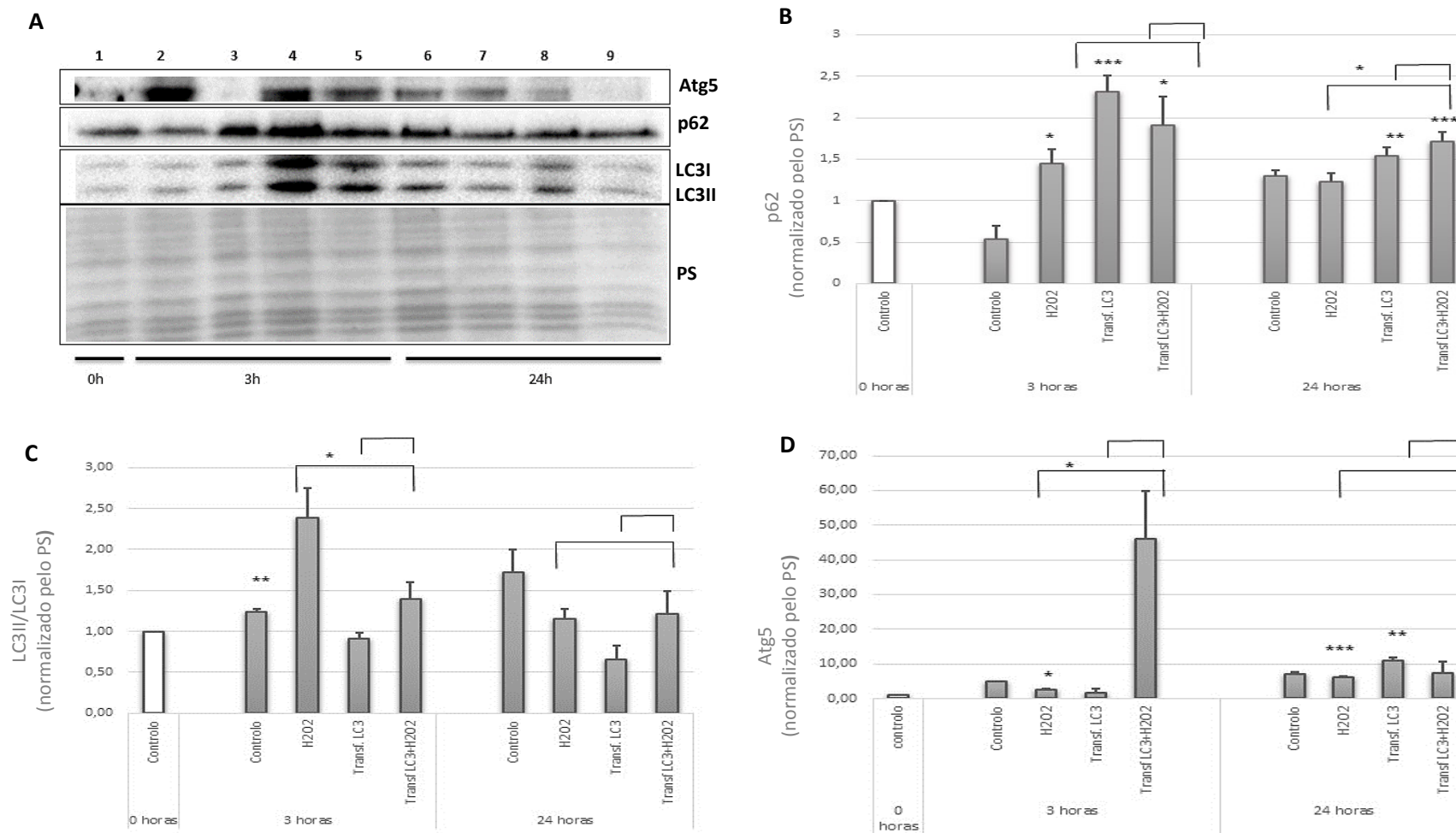
Para averiguar a hipótese de que a sobreexpressão da LC3B-mCherry anteciparia a ativação da autofagia e preveniria a acumulação de proteínas oxidadas, de células transfectadas recolheram-se extratos celulares para análise e quantificação de marcadores proteicos da autofagia e de proteínas carboniladas.

A expressão da proteína p62 (figura 14 – **B**) aumentou em quase todas as condições relativamente ao controlo das 0 horas, exceto o controlo das 3 horas. Houve aumento significativo às 3 horas nas condições peróxido de hidrogénio (\* $P < 0,05$ ), transfeção (\*\* $P < 0,001$ ) e transfeção com stresse (\* $P < 0,05$ ). Em apoio deste resultado, o estudo imunocitoquímico também mostrou aumento de p62 nas células transfectadas (figura 16 – **B**) comparativamente às controlo (figura 16 – **A**), assim como as células transfectadas e submetidas a  $H_2O_2$  (figura 16 – **C**).

Apesar de às 24 horas a expressão de p62 diminuir relativamente às 3 horas, houve um aumento significativo nas células transfectadas (\*\* $P < 0,01$ ) e nas transfectadas submetidas a stresse com  $H_2O_2$  (\*\* $P < 0,001$ ) em relação às 0 horas. Para além disso, às 24 horas confirmou-se um aumento significativo (\* $P < 0,05$ ) relativamente às células com peróxido para as células transfectadas com peróxido de hidrogénio.

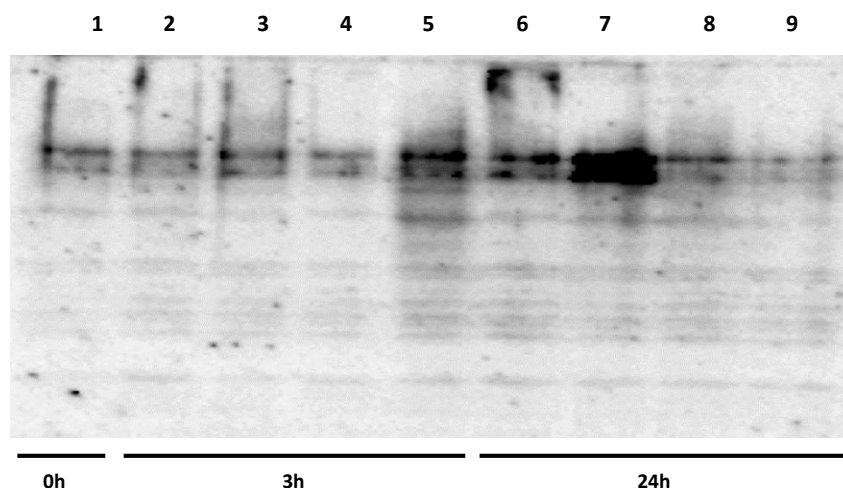
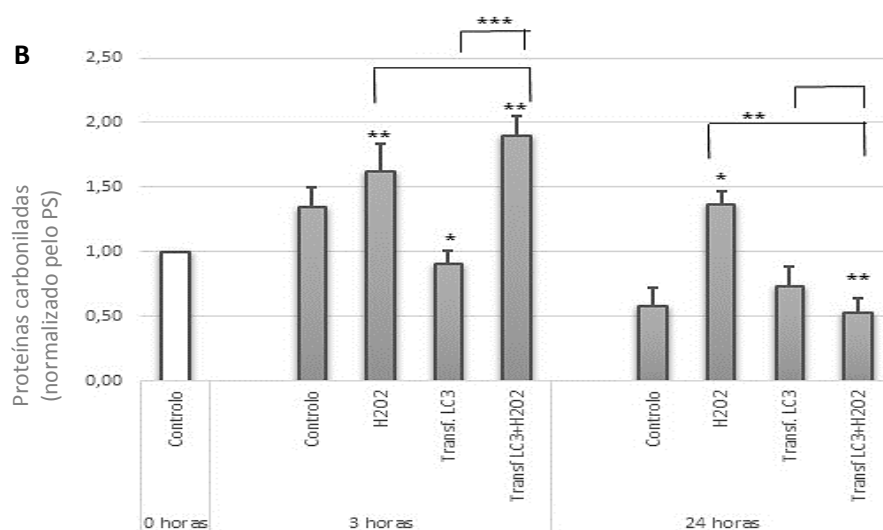
A expressão da LC3 também teve aumento ao longo do tempo, exceto na condição transfeção, apenas. O gráfico **C** da figura 14, mostra aumento significativo do controlo 0 horas para o controlo 3 horas (\*\* $P < 0,001$ ). Por outro lado, às 3 horas na condição em que ocorreu transfeção sob stresse, a quantidade de LC3 diminui significativamente (\* $P < 0,05$ ) quando comparada com a quantidade de proteína na condição apenas de células tratadas com  $H_2O_2$ .

Na quantificação da proteína Atg5 (figura 14 – **D**) foi verificado aumento significativo às 3 (\* $P < 0,05$ ) e 24 horas (\*\* $P < 0,001$ ) nas condições em que as células estavam sob stresse, assim como às 24 horas (\*\* $P < 0,01$ ) nas células transfectadas mas sem stresse. Ao contrário da proteína LC3, a atg5 aumentou significativamente comparativamente às condições 3 horas com peróxido de hidrogénio para as células transfectadas com peróxido de hidrogénio.



**FIGURA 14 – Marcadores proteicos de autofagia em células HeLa transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherry e submetidas a 100  $\mu$ M de  $H_2O_2$ , durante 3 e 24h e estudo densitométrico de bandas após Western Blotting (B,C e D). A:** Blot representativo do teor de Atg5, p62 e LC3 nas seguintes condições: 1- Controlo 0h; 2 – Controlo 3h; 3 –  $H_2O_2$  3h; 4 – Transfetadas 3h; 5 – Transfetadas +  $H_2O_2$ , 3h; 6 – Controlo 24h; 7 –  $H_2O_2$  24h; 8 – Transfetadas 24h; 9 – Transfetadas +  $H_2O_2$ , 24h. **B –** Proteína p62. **C –** Proteína LC3II/LC3I. **D –** Proteína Atg5. Os resultados foram normalizados usando a densidade das bandas no papel de nitrocelulose corados com Ponceau S. Dados correspondem à média  $\pm$  SEM de três ensaios independentes, condições controlos às 0 horas definidos como sendo 1 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; segundo o teste  $t$  de student bicaudal).

## 5.2 Proteínas carboniladas

**A****B**

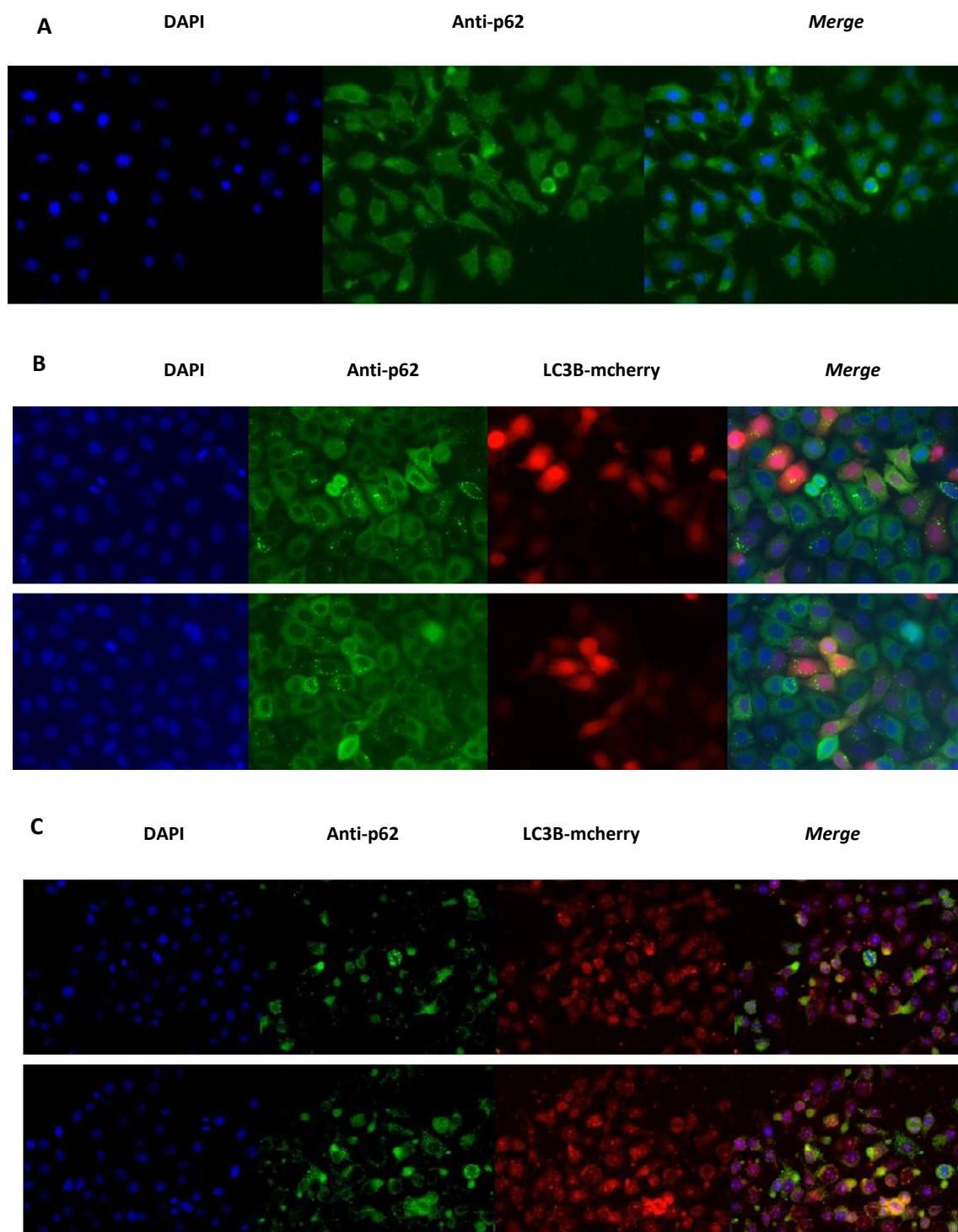
**FIGURA 15 - Pesquisa de proteínas carboniladas.** **A** – Revelação por quimioluminescência da membrana após pesquisa de proteínas carboniladas. **1** - Controle 0h; **2** – Controle 3h; **3** – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3h; **4** – Transfetadas 3h; **5** – 3h transfetadas + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **6** – Controle 24h; **7** –H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24h; **8** –transfetadas, 24h; **9** –transfetadas + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24h. **B** – Representação gráfica dos níveis de proteínas carboniladas. Os resultados foram normalizados usando a densidade das bandas no papel de nitrocelulose corado com Ponceau S. Dados correspondem à média ± SEM de três ensaios independentes, com os dados provenientes da situação controles 0 horas definidos como sendo 1 (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, segundo o teste *t* de student bicaudal).

Simultaneamente à quantificação dos marcadores da autofagia procedeu-se à análise e quantificação de proteínas carboniladas (figura 15 - **A** e **B**), detetadas por Western Blotting. Depois da derivatização dos grupos carbonilo das proteínas presentes na membrana, e posterior revelação por quimioluminescência (figura 15 –**A**), observou-se que há aumento de intensidade das bandas, em todas as condições sob stress, exceto às 24 horas na condição em que as células

estavam transfectadas com  $H_2O_2$ . Constatou-se, às 3 horas, através da representação gráfica da Figura 15 – **B**, aumento significativo de proteínas carboniladas (\*\* $P < 0,001$ ) na condição em que as células foram transfectadas e submetidas a stresse, comparativamente com a condição  $H_2O_2$  apenas. Às 24 horas, a condição  $H_2O_2$  aumentou claramente a quantidade de carbonilos mas todas as outras diminuíram. Observou-se a diminuição significativa (\*\* $P < 0,01$ ) na condição transfectadas com  $H_2O_2$ , comparativamente ao controlo das 0 horas, assim como à condição às 24 horas com  $H_2O_2$  apenas.



## 5.3 Imunocitoquímica



**FIGURA 16** - Imunocitoquímica de p62 em células HeLa em cultura ao fim 3 horas. **A**- Controlo. **B** – Células transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherryY. **C** - Células transfetadas com pcDNA3.1 hLC3B-mCherryY e submetidas a 100  $\mu$ M DE  $H_2O_2$  com o marcador de núcleos e o anticorpo anti-p62. Núcleos marcados com DAPI. Visualização ao microscópio de fluorescência, Apotome.

# DISCUSSÃO

As células contam com as vias proteolíticas para manter a proteostasia celular e responder com sucesso a situações de stresse (Keller et al., 2004). Tanto a via proteassomal como a via macroautofágica (adiante designada autofagia) têm como objetivo remover proteínas danificadas. Da sua ineficácia resulta perda de proteostasia e esta associa-se ao processo do envelhecimento e permite a instalação de doenças associadas à idade (Castro et al., 2013).

A autofagia é considerada um mecanismo de compensação após inibição do proteossoma, (Wojcik, 2013) e é o único processo conhecido capaz de degradar substratos maiores como organelos, microrganismos, e agregados proteicos (Lamark et al., 2012). De facto experimentalmente, aquando da inibição do proteossoma, há ativação da autofagia, indicando a coordenação entre os dois sistemas de degradação proteica (Wojcik, 2013).

Tendo verificado em estudos anteriores que células sob stresse oxidativo inibiam o proteossoma (Castro et al., 2012) e ativavam a autofagia (Castro et al., manuscrito em preparação), tornou-se interessante estudar a intervenção de mecanismos moleculares subjacentes.

Tirando vantagem da análise genética e bioquímica de leveduras, foram identificados até à data 36 genes ATG (*autophagy-related genes*). Em geral as funções que cada proteína Atg codifica, mantiveram-se conservadas desde as leveduras até aos mamíferos (Maruyama et al., 2014).

Um dos marcadores proteicos para o processo de autofagia é o Atg5 que se conjuga com a proteína Atg12 por meio de ligações covalentes e por isso se comportam como uma única entidade. Esta, localiza-se na superfície citoplasmática da membrana durante o processo de elongação do fagóforo e dela se dissocia após a formação completa do autofagossoma (Mizushima et al., 2002). Ratinhos *knock-outs* Atg5<sup>-/-</sup> ou Atg7<sup>-/-</sup> com claros sinais de neurodegeneração mostraram a acumulação intracelular de proteínas agregadas e ubiquitinadas em células neuronais (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006).

Por outro lado, a proteína atg8 e o seu homólogo *microtubule-associated protein 1 light chain 3/MAP1LC3* (LC3) é também marcador útil que se localiza na superfície citoplasmática do autofagossoma tal como o complexo Atg12-Atg5 e ainda no interior da membrana. A proteína LC3 é igualmente detetada na membrana dos autofagolissomas, embora em quantidade menor do que nos autofagossomas (Pankiv et al., 2007; Seto et al., 2013). Logo após a sua síntese, o LC3 nascente, é clivado na extremidade C- terminal pela proteína Atg4, adquire um resíduo de glicina e torna-se LC3-I. Subsequentemente, a LC3-I é conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) para se tornar LC3-II, numa reação enzimática semelhante à ubiquitinação (Mizushima et al., 2010). Este processo ocorre durante a indução da autofagia e por isso, a sua presença confirma

o aumento da atividade autofágica (Hollomon et al., 2013). Entre as três isoformas da proteína LC3 (LC3A, LC3B e LC3C), a mais amplamente utilizada em experiências é a LC3B.

Para além da importância das proteínas Atg e dos seus homólogos na formação do autofagossoma, as interações com proteínas específicas têm um papel crucial na autofagia seletiva. Nos mamíferos, a proteína p62/Sqstm1 (referida apenas como p62) é o substrato da autofagia mais bem caracterizado; identificado nos autofagossomas em formação e ligado diretamente ao LC3 através da região de interação (LIR – LC3-interacting region) esta proteína é subsequentemente incorporada no autofagossoma e finalmente degradada (Maruyama et al., 2014).

No presente estudo com células Jurkat expostas a stresse oxidativo, verificou-se que ao longo do tempo, estas exibiam diminuição da expressão da proteína p62 e aumento da expressão da proteína LC3 (o rácio entre os níveis de LC3II/LC3I), indicando ativação da autofagia. Esta correlação vem dar ênfase ao conceito de que, juntamente com a LC3, a proteína p62 é degradada no interior dos autofagolisossomas (Maruyama et al., 2014). Para além da variação de expressão de LC3 e p62 encontrados, o aumento de expressão da proteína atg5 (Hollomon et al., 2013) e proteínas carboniladas sustentam a indução da autofagia.

Ao longo dos anos tem sido atribuído um papel importante do proteassoma 20S na remoção de proteínas oxidadas. A maioria de estudos mostra que o proteassoma 20S é o complexo chave nessa remoção (K. J. Davies, 2001; Jung et al., 2008). Este complexo é mais resistente ao stresse oxidativo, comparado com o proteassoma 26S, e consegue manter a sua atividade sob condições oxidativas provocadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reinheckel et al., 1998; Reinheckel et al., 2000). O reconhecimento de proteínas oxidadas decorre da exposição dos seus resíduos hidrofóbicos, normalmente confinados ao interior da proteína, que induzem mudanças na estrutura 20S e promovem a abertura do canal para a sua degradação (K. J. A. Davies, 2001; Jung et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que as proteínas oxidadas não são preferencialmente ubiquitinadas, sugerindo que o proteassoma 26S não desempenha qualquer papel na sua degradação (Kastle et al., 2012).

Durante muito tempo, proteassoma e autofagia, foram considerados como correspondendo a duas vias celulares independentes, mas descobertas recentes sugerem que, pelo menos em algumas circunstâncias, há uma ligação entre os dois sistemas, como parte de um mecanismo de compensação. Há alguma evidência de que as duas vias partilham os mesmos substratos e partículas reguladoras, como as proteínas p62, neighbour of breast cancer 1 (NBR1), e Autophagy-linked FYVE protein (Alfy) (Hohn et al., 2013).

Atendendo à variação das proteínas p62, LC3 e Atg5 acima descrita, utilizou-se um inibidor do proteassoma na tentativa de perceber se o mecanismo compensatório por parte da via autofágica se mantinha ativo aquando da inibição do proteassoma.

Uma vez que a expressão da proteína p62 diminuía bastante ao fim de 24 horas, seria de esperar que assim se mantivesse com um inibidor do proteassoma, que induz a autofagia como mecanismo de compensação (Liu et al., 2012). De facto, a expressão de p62 continuava diminuída, mas, inesperadamente, houve também diminuição na expressão da proteína LC3, numa condição de suposta autofagia induzida. Na ausência de dados relativos a tempos anteriores às 24 horas de estímulo, não é possível estabelecer uma causa. Todavia admitimos que o inibidor do proteassoma tenha induzido antecipado a autofagia.

Esta hipótese é compatível com a elevada expressão da proteína Atg5 e da quantidade diminuída de proteínas carboniladas. De facto, às 24 horas há diminuição de teor de carbonilos em comparação com os controlos, sugerindo degradação anterior de proteínas carboniladas. Note, por exemplo, em apoio desta possibilidade é a quantidade superior de proteínas carboniladas às 3 e às 24 horas na condição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apenas. Para além de aumentarmos *time points* para perceber o que aconteceu até às 24 horas, será útil medir a atividade do proteassoma e a dos lisossomas.

A regulação da autofagia é complexa e está ligada a múltiplas vias de sinalização a diferentes níveis (Sokollik et al., 2011), das quais a via mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) é a mais estudada nos mamíferos. O mTOR é o homólogo mamífero da proteína cínase TOR das leveduras, que regula negativamente a autofagia. A via mTOR inclui dois complexos funcionais: o complexo 1 mTOR (mTORC1) sensível à rapamicina e regulador da autofagia, e o complexo 2 mTOR (mTORC2) que não é um regulador direto da autofagia. Diversos sinais, como fatores de crescimento, aminoácidos, glicose, estados energéticos e diferentes formas de stresse regulam a via mTORC1. A privação de nutrientes estabilizam-na, inibem o mTORC1 e induzem a autofagia.

A maior cascata de sinalização que controla a mTORC1 é a via PI3K (complex of phosphatidylinositol 3-kinases). Classes diferentes do PI3K, têm efeitos distintos na autofagia. Aumentando o produto da classe I do PI3K, PIP<sub>3</sub>, induz-se a Akt e inibe-se a autofagia, enquanto que, aumentando o produto da classe III do PI3K, PI3P, estimula-se a autofagia (Ravikumar et al., 2010).

Embora todos os inibidores de PI3K testados tenham como alvo a classe I e a classe III PI3K indiscriminadamente, tem sido proposto que a inibição da classe III bloqueia a produção de PI3P, essencial para a ativação da autofagia pelo recrutamento de outras proteínas ATG na formação do fagóforo (Wu et al., 2010).

Assim, usou-se um inibidor da autofagia, o 3-MA, admitindo-se que na ausência de mecanismo compensatório do proteassoma, acumular-se-ia proteína p62 (Su et al., 2011), diminuiria LC3 (Wu et al., 2010) e aumentariam as proteínas carboniladas (Zhang, 2013). No entanto, verificou-se que às 24 horas, a expressão de p62 era menor comparativamente ao controlo, assim como a da LC3 e a das proteínas carboniladas. De novo, na ausência de dados de tempos anteriores, admitiu-se que o inibidor tenha sido administrado em dose insuficiente e a autofagia tenha sido apenas parcialmente inibida.

Todavia, a quantidade de proteínas carboniladas, assim como a expressão da p62, indicam ligeiro aumento comparativamente à condição com lactacistina, sem ultrapassar os valores do controlo às 0 horas. Para além disso, a quantidade aumentada de proteínas oxidadas nesta condição, em comparação com o uso do inibidor de autofagia é superior à condição, com o inibidor do proteassoma, o que sugere a inexistência de mecanismo compensatório por parte do proteassoma aquando da inibição da autofagia.

Em geral tem sido referido que a inibição do proteassoma induz a autofagia, mas estas doses indicam que a inibição da autofagia não parece induzir a degradação proteassomal. Na verdade, segundo o que está descrito, a inibição da autofagia prejudica a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma na degradação dos alvos específicos (Hohn et al., 2013; Korolchuk et al., 2009; Lilienbaum, 2013).

Assim sendo, promoveu-se a sobreexpressão transiente de LC3B-mCherry, na tentativa de antecipar a ativação da autofagia e perceber se seria suficiente ou necessária para evitar a acumulação de proteínas oxidadas após estímulo oxidativo.

Como se pode observar pelo gráfico da viabilidade celular, apenas na condição em que as células foram sujeitas à transfeção e ao stresse oxidativo durante 24 horas houve mais de 40% de perda de viabilidade celular. Como justificação deste resultado, admitiu-se que a presença de possíveis agregados no lisossoma, onde o corante é aprisionado intracelularmente, pode estar a impedir a sua entrada. Portanto, a menor incorporação do corante favorece falsos negativos, tendo como resultado menor percentagem de células viáveis. Seriam necessários mais ensaios com diferentes testes de viabilidade para confirmar esta hipótese.

Nas células transfetadas, após stresse oxidativo seria de esperar um decréscimo na expressão da proteína p62 paralelamente com a LC3-II, conseqüente à sua degradação por indução da autofagia. Porém por imunocitoquímica, verificou-se que em células HeLa transfetadas com LC3B-mCherry, a LC3 está co localizada com a p62, principalmente na condição sob stresse oxidativo, aparentando formar regiões mais densas de ambas as proteínas no mesmo local (Pankiv et al., 2007). Esta observação é compatível com outras. Por exemplo, Shintaro Seto e colaboradores, investigaram o mecanismo de formação dos autofagossomas em

células dendríticas infetadas com *M. tuberculosis*, e reportaram que as proteínas p62 e LC3 se localizavam na mesma estrutura (Seto et al., 2013). Em apoio, empregando células HeLa transfetadas e testes de imunoprecipitação, verificou-se existir interação direta entre a p62 endógena e outras proteínas homólogas do Atg8. Essa abordagem também identificou que o p62 endógeno tem como principal ligação o LC3B em células HeLa (Pankiv et al., 2007).

Acresce que membros da família LC3 são também capazes de recrutar p62, entre proteínas adaptadoras (Lilienbaum, 2013), indicando que o aumento da expressão de LC3B (por transfeção por exemplo) aumenta o recrutamento de mais p62 e a sua expressão, circunstância por nós verificada.

Relativamente às proteínas carboniladas seria de esperar a sua diminuição comparativamente à condição com peróxido, o que não acontece às três horas. Pelo contrário, nas mesmas condições às 24 horas houve diminuição de carbonilos nas células transfetadas sob stresse relativamente às células só com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A acumulação de proteínas oxidadas às 3 horas pode dever-se ao facto do proteassoma estar a ser inibido pelo stresse oxidativo, como se demonstrou em trabalhos anteriores (Castro et al., 2012)

Devido ao excesso de intervenientes da autofagia existentes na célula, como consequência de sobreexpressão da LC3B, pode estar a haver uma agregação do material celular não sendo imediatamente degradado após o estímulo oxidativo. Por este mecanismo não ser suficientemente rápido a curto prazo, pode formar pequenos agregados que inibiram a atividade do proteassoma. Esse agressoma é considerado um mecanismo de defesa celular (Arrasate et al., 2004). A formação desta agregação pode facilitar a sua entrada nos autofagossomas, e os próprios agregados podem funcionar como locais de nucleação para o fagóforo. O conjunto de substratos da autofagia em grandes agregados é uma característica comum da autofagia seletiva (Johansen et al., 2014), a agrefagia (Lamark et al., 2012). O resultado que pode reforçar esta hipótese é a diminuição significativa de proteínas carboniladas às 24 horas nas células transfetadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparativamente à condição em que as células apenas foram sujeitas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Através dos resultados desta experiência, concluiu-se que sobreexpressar a LC3B não foi a maneira mais eficaz de antecipar a autofagia e prevenir a acumulação de proteínas oxidadas a curto prazo. A longo prazo, segundo os resultados, podemos considerar que sim, visto haver uma redução de carbonilos às 24 horas, comparativamente ao controlo das 0 horas, assim como com as células sob stresse oxidativo.

Através dos resultados conseguimos perceber que existe um mecanismo compensatório por parte da autofagia aquando da inibição do proteassoma. De facto, estes resultados levam a acreditar que a proteostasia está dependente da interação destas duas vias.

Apesar de existir um consenso em estudos anteriores sobre o mecanismo compensatório por parte da autofagia aquando da inibição do proteassoma, concordando com os nossos resultados, trabalhos futuros seriam necessários para perceber se existe um mecanismo compensatório inverso.

Relativamente a sobreexpressão da proteína LC3B, esta estratégia parece ser útil no combate à acumulação de agregados proteicos induzidos pelo dano oxidativo.



# CONCLUSÃO

- O stresse oxidativo, tanto nas células Jurkat como nas células HeLa, aumenta o nível de proteínas carboniladas ao longo do tempo.
- A inibição do proteossoma parece induzir a autofagia.
- A inibição da autofagia não parece induzir a atividade do proteassoma.
- Sobreexpressão de LC3B parece ser uma estratégia útil no combate ao dano oxidativo.
- A proteostasia estará então dependente da interação da via proteossomica e lisossomal.

## **R**EFERÊNCIAS **B**IBLIOGRÁFICAS

- Abou-Zeid, L., & Baraka, H. N. (2014). Combating oxidative stress as a hallmark of cancer and aging: Computational modeling and synthesis of phenylene diamine analogs as potential antioxidant. *Saudi Pharm J*, 22(3), 264-272. doi: 10.1016/j.jsps.2013.07.009
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431(7010), 805-810. doi: 10.1038/nature02998
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., . . . Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182(4), 685-701. doi: 10.1083/jcb.200803137
- Azevedo, C., Fonseca, M., Ferreira, J. (2005). A Célula. *Biologia Celular e Molecular*, pp. 1-17
- Bader, N., & Grune, T. (2006). Protein oxidation and proteolysis. *Biol Chem*, 387(10-11), 1351-1355. doi: 10.1515/bc.2006.169
- Benbrook, D. M., & Long, A. (2012). Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol*, 34(3), 286-297.
- Bokov, Alex, Chaudhuri, Asish, & Richardson, Arlan. (2004). The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10-11), 811-826. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.009>
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976 May 7;72:248-54.
- B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed., Oxford University Press, Oxford, 2007.
- Cai, Zhiyou, & Yan, Liang-Jun. (2013). Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *Journal of biochemical and pharmacological research*, 1(1), 15-26.
- Castro, J. P., Jung, T., Grune, T., & Almeida, H. (2013). Actin carbonylation: from cell dysfunction to organism disorder. *J Proteomics*, 92, 171-180. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.006
- Castro, J. P., Ott, C., Jung, T., Grune, T., & Almeida, H. (2012). Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free Radic Biol Med*, 53(4), 916-925. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.005
- Cecconi, Francesco, & Levine, Beth. (2008). The Role of Autophagy in Mammalian Development: Cell Makeover Rather than Cell Death. *Developmental Cell*, 15(3), 344-357. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.012>

- Cerny, M., Skalak, J., Cerna, H., & Brzobohaty, B. (2013). Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *J Proteomics*, 92, 2-27. doi: 10.1016/j.jprot.2013.05.040
- Dalle-Donne, Isabella, Giustarini, Daniela, Colombo, Roberto, Rossi, Ranieri, & Milzani, Aldo. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9(4), 169-176. doi: 10.1016/s1471-4914(03)00031-5
- Das, R., Ponnappan, S., & Ponnappan, U. (2007). Redox regulation of the proteasome in T lymphocytes during aging. *Free Radic Biol Med*, 42(4), 541-551. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.020
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*, 262(20), 9895-9901.
- Davies, K. J. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, 83(3-4), 301-310.
- Davies, K. J., & Delsignore, M. E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem*, 262(20), 9908-9913.
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*, 1703(2), 93-109. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007
- Ding, Q., Bruce-Keller, A. J., Chen, Q., & Keller, J. N. (2004). Analysis of gene expression in neural cells subject to chronic proteasome inhibition. *Free Radic Biol Med*, 36(4), 445-455. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.025
- Driscoll, J. J., & Chowdhury, R. D. (2012). Molecular crosstalk between the proteasome, aggresomes and autophagy: translational potential and clinical implications. *Cancer Lett*, 325(2), 147-154. doi: 10.1016/j.canlet.2012.06.016
- Eaton, Philip. (2006). Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(11), 1889-1899. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.037>
- Edrey, Yael H., & Salmon, Adam B. (2014). Revisiting an age-old question regarding oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 71, 368-378. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.038>
- Fedorova, M., Kuleva, N., & Hoffmann, R. (2009). Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle proteins in a rat model of acute oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 1792(12), 1185-1193. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.011
- Finkel, Toren. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, 194(1), 7-15. doi: 10.1083/jcb.201102095
- Grune, T. (2000). Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology*, 1(1), 31-40.

- Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K. J. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), 2519-2530. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.020
- Grune, Tilman, Merker, Katrin, Sandig, Grit, & Davies, Kelvin J. A. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), 709-718. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00809-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00809-X)
- Gutteridge, John M. C., & Halliwell, Barry. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>
- Halliwell, Barry, & Gutteridge, John M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125-126. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3)
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., . . . Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885-889. doi: 10.1038/nature04724
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3), 298-300.
- Headlam, H. A., & Davies, M. J. (2004). Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic Biol Med*, 36(9), 1175-1184. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.017
- Hohn, A., Jung, T., & Grune, T. (2014). Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. *Free Radic Biol Med*, 71, 70-89. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.028
- Hohn, A., Konig, J., & Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics*, 92, 132-159. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.004
- Hollomon, M. G., Gordon, N., Santiago-O'Farrill, J. M., & Kleinerman, E. S. (2013). Knockdown of autophagy-related protein 5, ATG5, decreases oxidative stress and has an opposing effect on camptothecin-induced cytotoxicity in osteosarcoma cells. *BMC Cancer*, 13, 500. doi: 10.1186/1471-2407-13-500
- Hu, Xinyu, Zhang, Haina, Zhang, Yizhi, Zhang, Ying, Bai, Ling, Chen, Qiuhui, . . . Zhang, Lei. (2014). Differential protein profile of PC12 cells exposed to proteasomal inhibitor lactacystin. *Neuroscience Letters*, 575, 25-30. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.05.021>
- Johansen, Terje, & Lamark, Trond. (2014). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296. doi: 10.4161/auto.7.3.14487

- Johnston, J. A., Ward, C. L., & Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143(7), 1883-1898.
- Jung, T., Bader, N., & Grune, T. (2007). Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys*, 462(2), 231-237. doi: 10.1016/j.abb.2007.01.030
- Jung, T., & Grune, T. (2008). The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life*, 60(11), 743-752. doi: 10.1002/iub.114
- Jung, T., Catalgol, B., & Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Mol Aspects Med*, 30(4), 191-296. doi: 10.1016/j.mam.2009.04.001
- Jung, T., Engels, M., Kaiser, B., Poppek, D., & Grune, T. (2006). Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 40(8), 1303-1312. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.023
- Jung, Tobias, Bader, Nicolle, & Grune, Tilman. (2007). Oxidized proteins: Intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), 231-237. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2007.01.030>
- Jung, Tobias, Catalgol, Betül, & Grune, Tilman. (2009). The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(4), 191-296. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001>
- Kastle, M., Reeg, S., Rogowska-Wrzesinska, A., & Grune, T. (2012). Chaperones, but not oxidized proteins, are ubiquitinated after oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 53(7), 1468-1477. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.039
- Keller, J. N., Dimayuga, E., Chen, Q., Thorpe, J., Gee, J., & Ding, Q. (2004). Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), 2376-2391. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.003
- Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*, 118(Pt 1), 7-18. doi: 10.1242/jcs.01620
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., . . . Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), 880-884. doi: 10.1038/nature04723
- Korolchuk, V. I., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2009). A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy*, 5(6), 862-863.
- Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., . . . Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol*, 13(4), 453-460. doi: 10.1038/ncb2204
- Lamark, T., & Johansen, T. (2012). Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol*, 2012, 736905. doi: 10.1155/2012/736905

- Lee, H. K., & Marzella, L. (1994). Regulation of intracellular protein degradation with special reference to lysosomes: role in cell physiology and pathology. *Int Rev Exp Pathol*, 35, 39-147.
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4), 463-477.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018
- Levine, R. L. (1983). Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem*, 258(19), 11823-11827.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol*, 36(9), 1495-1502.
- Levine, Rodney L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease<sup>2,3</sup>. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 790-796. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00765-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00765-7)
- Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*, 4(1), 1-26.
- Lindquist, S. L., & Kelly, J. W. (2011). Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a004507
- Liu, C., Yan, X., Wang, H. Q., Gao, Y. Y., Liu, J., Hu, Z., . . . Lin, B. (2012). Autophagy-independent enhancing effects of Beclin 1 on cytotoxicity of ovarian cancer cells mediated by proteasome inhibitors. *BMC Cancer*, 12, 622. doi: 10.1186/1471-2407-12-622
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120(2), 237-248. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.046
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 741-752. doi: 10.1038/nrm2239
- Martens, S., & Bachmair, A. (2015). How cells coordinate waste removal through their major proteolytic pathways. *Nat Cell Biol*, 17(7), 841-842. doi: 10.1038/ncb3198
- Maruyama, Yoko, Sou, Yu-Shin, Kageyama, Shun, Takahashi, Takao, Ueno, Takashi, Tanaka, Keiji, . . . Ichimura, Yoshinobu. (2014). LC3B is indispensable for selective autophagy of p62 but not basal autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(1), 309-315. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.093>



- Mizushima, N., & Klionsky, D. J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, 27, 19-40. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*, 27(6), 421-429.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), 313-326. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028
- Mizushima, Noboru, Yoshimori, Tamotsu, & Levine, Beth. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, 140(3), 313-326. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
- Moller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A., & Rao, R. S. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics*, 74(11), 2228-2242. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.004
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*, 43(4), 477-503. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034
- Noori, Shafaq. (2012). An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 01(08). doi: 10.4172/scientificreports.413
- Nowotny, K., Jung, T., Grune, T., & Hohn, A. (2014). Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging. *Exp Gerontol*, 57, 122-131. doi: 10.1016/j.exger.2014.05.016
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., & Stadtman, E. R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem*, 262(12), 5488-5491.
- Oroian, Mircea, & Escriche, Isabel. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>
- Pacifici, R. E., & Davies, K. J. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37(1-3), 166-180.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., . . . Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282(33), 24131-24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200
- Pisoschi, Aurelia Magdalena, & Pop, Aneta. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Ponnappan, U., Zhong, M., & Trebilcock, G. U. (1999). Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: A role in immune senescence. *Cell Immunol*, 192(2), 167-174. doi: 10.1006/cimm.1998.1418

- Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol*, 1, 304-312. doi: 10.1016/j.redox.2013.04.005
- Rajawat, Y. S., Hilioti, Z., & Bossis, I. (2009). Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res Rev*, 8(3), 199-213. doi: 10.1016/j.arr.2009.05.001
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., . . . Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90(4), 1383-1435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J., & Grune, T. (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J*, 335 ( Pt 3), 637-642.
- Reinheckel, T., Ullrich, O., Sitte, N., & Grune, T. (2000). Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*, 377(1), 65-68. doi: 10.1006/abbi.2000.1717
- Rivett, A. J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J*, 291 ( Pt 1), 1-10.
- Rock, Kenneth L., Gramm, Colette, Rothstein, Lisa, Clark, Karen, Stein, Ross, Dick, Lawrence, . . . Goldberg, Alfred L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78(5), 761-771. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90462-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90462-6)
- Rubinsztein, David C, Mariño, Guillermo, & Kroemer, Guido. (2011). Autophagy and Aging. *Cell*, 146(5), 682-695. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>
- Salminen, Antero, & Kaarniranta, Kai. (2009). Regulation of the aging process by autophagy. *Trends in Molecular Medicine*, 15(5), 217-224. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2009.03.004>
- Seto, S., Tsujimura, K., Horii, T., & Koide, Y. (2013). Autophagy adaptor protein p62/SQSTM1 and autophagy-related gene Atg5 mediate autophagosome formation in response to Mycobacterium tuberculosis infection in dendritic cells. *PLoS One*, 8(12), e86017. doi: 10.1371/journal.pone.0086017
- Shringarpure, R., Grune, T., & Davies, K. J. (2001). Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 58(10), 1442-1450.
- Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., & Davies, K. J. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*, 278(1), 311-318. doi: 10.1074/jbc.M206279200
- Shringarpure, Reshma, & Davies, Kelvin J. A. (2002). Protein turnover by the proteasome in aging and disease1,2. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1084-1089. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00824-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00824-9)

- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82(2), 291-295.
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol*, 36(9), 1539-1550.
- Sokollik, C., Ang, M., & Jones, N. (2011). Autophagy: a primer for the gastroenterologist/hepatologist. *Can J Gastroenterol*, 25(12), 667-674.
- Stadtman, E. R. (1988). Biochemical markers of aging. *Exp Gerontol*, 23(4-5), 327-347.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 191-208.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207-218. doi: 10.1007/s00726-003-0011-2
- Su, H., & Wang, X. (2011). p62 Stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress. *Trends Cardiovasc Med*, 21(8), 224-228. doi: 10.1016/j.tcm.2012.05.015
- Todde, Virginia, Veenhuis, Marten, & van der Klei, Ida J. (2009). Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(1), 3-13. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.016>
- van der Vaart, A., & Reggiori, F. (2010). The Golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes. *Autophagy*, 6(6), 800-801. doi: 10.1091/mbc.E09-04-0345
- Volker, C., & Lupas, A. N. (2002). Molecular evolution of proteasomes. *Curr Top Microbiol Immunol*, 268, 1-22.
- Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*, 7(12), 1875-1884.
- Wang, Y., & Qin, Z. H. (2013). Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta Pharmacol Sin*, 34(5), 585-594. doi: 10.1038/aps.2012.194
- Wen, X., Wu, J., Wang, F., Liu, B., Huang, C., & Wei, Y. (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radic Biol Med*, 65, 402-410. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.013
- Wojcik, S. (2013). Crosstalk between autophagy and proteasome protein degradation systems: possible implications for cancer therapy. *Folia Histochem Cytobiol*, 51(4), 249-264. doi: 10.5603/fhc.2013.0036
- Wójcik, Cezary, & DeMartino, George N. (2003). Intracellular localization of proteasomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(5), 579-589. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00380-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00380-1)

- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(12), a006734. doi: 10.1101/cshperspect.a006734
- Wooten, M. W., Geetha, T., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., Peng, J., Cox, N., . . . Moscat, J. (2008). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, 283(11), 6783-6789. doi: 10.1074/jbc.M709496200
- Wu, Y. T., Tan, H. L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M. R., . . . Shen, H. M. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 285(14), 10850-10861. doi: 10.1074/jbc.M109.080796
- Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., & Rapoport, T. A. (2005). Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40), 14132-14138. doi: 10.1073/pnas.0505006102
- Zhang, Jianhua. (2013). Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biology*, 1(1), 19-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.008>